UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

MARIA CLAUDIA PEREDA FRANCISCHINI

Caracterização dos fatores sigma da RNA polimerase do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

14/07/2010

MARIA CLAUDIA PEREDA FRANCISCHINI

Caracterização dos fatores sigma da RNA polimerase do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.

Tese apresentada ao Instituto de

Química da Universidade de São Paulo para

obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo

14/07/2010

MARIA CLAUDIA PEREDA FRANCISCHINI

"Caracterização dos fatores sigma da RNA polimerase do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri."

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura_____

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura_____

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura_____

Ao meu marido Carlos pelo amor,companheirismo,

pelo incessante apoio e compreensão

À minha filha Manuela pelo amor incondicional e

por proporcionar momentos maravilhosos na minha vida

Ao meu pai Alfonso ("in memorium") e a minha mãe Francis

Aos meus irmãos Alfonso Jr. e Alexandre

Aos meus sobrinhos Isadora, Gabriela e Henrique

Com amor

Dedico

AGRADECIMENTO

Ao meu marido Carlos, que sempre esteve disponível, me ajudando, criticando quando necessário, sugerindo idéias e orientando. Muito obrigada, você foi muito importante ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Shaker Chuck Farah pela confiança depositada em mim para a realização deste projeto de pesquisa.

À Dra. Cássia Docena com quem tive o grande prazer de trabalhar durante a minha iniciação científica e boa parte do meu doutorado, pelo que me ensinou com sua dedicação, paciência e profissionalismo e principalmente pelas constantes demonstrações de amizade. Muito obrigada

Aos meus amigos e colegas de laboratório: da primeira geração Cássia, Marcos, Éric, D.Cleusa e Alessandra, da segunda geração Paola, Max, Miryam, Luci, Ilda, Camila, Fernando, Diorge, Cristiane e finalmente da terceira geração Pricila, Raphael e Maycon pelo apoio, pela amizade pelo companheirismo, e pelas discussões científicas e pelo bate papo na hora do café.

À minha amiga Kátia por ter me ensinado e apresentado o “mundo do RNA”.

Por fim, aos meus pais Alfonso (“in memoriun”) e Francis pela boa educação, pela dedicação e muitas vezes o sacrifício para oferecer o melhor. Não foi nada fácil, mas valeu a pena e com certeza tudo o que eu sou eu devo a vocês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e ao CNPq.

“O tempo é muito lento para os que espera

Muito rápido para os que tem medo

Muito longo para os que lamentam

Muito curto para os que festejam

Mas, para os que amam, o tempo é eterno”

William Shakespeare

RESUMO

Francischini, M.C.P. **Caracterização dos fatores sigma da RNA polimerase do fitopatógenos *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.** 2010. 177p. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A citricultura é de grande importância para as atividades agrícolas brasileiras, uma vez que o Brasil é o principal produtor e exportador de suco de laranja. O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*) é um grave problema nesse setor, causando um elevado prejuízo na produção de frutos e seus derivados. O fator sigma é a subunidade da RNA polimerase que tem a função de direcionar o núcleo da RNA polimerase a uma classe específica de sequências promotoras. Como a maioria das bactérias sintetiza diversos fatores sigma, essa característica proporciona à bactéria a oportunidade de manutenção basal da sua expressão gênica, assim como, a regulação em resposta a alterações ambientais e a sinais durante o desenvolvimento bacteriano. O genoma de *Xac* codifica para 14 fatores sigma. Nesse presente trabalho, detectamos interações dos fatores σ^{ECF} (Xac2814. Xac3989, Xac0922, Xac1319, Xac1380, Xac1682, Xac4129 e Xac2191) e seus fatores anti-σ cognatos (Xac2815. Xac3988, Xac0921, Xac1320, Xac1379, Xac1681, Xac4130 e Xac2192). Além disso, observamos interações entre o fator σ^{FliA} (Xac1933) e o anti-σ_{FlgM} (Xac1989), seu fator anti-σ cognato. A caracterização das cepas nocautes para alguns fatores σ apontaram o envolvimento do fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ no mecanismo de formação de flagelo, a contribuição do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ na resposta ao choque térmico e a participação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ no crescimento bacteriano em condições de carência de ferro.

Palavras-chave: *Xanthomonas*, fatores sigma, ECF (fator sigma função extracitoplasmática), TTSS (Sistema de secreção do tipo III)

ABSTRACT

Francischini, M.C.P. **Caracterization of RNA polimerase sigma factor of phythopathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri.** 2010. 177p. Ph.D. Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Citriculture is an important sector of the economy of the State of São Paulo. Citrus canker, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac), is a devastating disease responsible for large agribusiness losses every year. several sigma factors. The sigma factor is the subunit of RNA polymerase that serves to direct the RNA polymerase core to a specific class of promoter sequences. Most bacteria code for more than one sigma factor, which provides the cell with the means by which to maintain basal gene expression while at the same time modulate the expression of specific genes in response in environmental changes and signals during bacterial growth. The Xac genome codes for 14 sigma factors which are the objects of study in this thesis. We demonstrate that many of the sigma factors of the σ^{ECF} family (Xac2814, Xac3989, Xac0922, Xac1319, Xac1380, Xac1682, Xac4129 e Xac2191) interact with cognate anti-σ factors (Xac2815, Xac3988, Xac0921, Xac1320, Xac1379, Xac1681, Xac4130 e Xac2192). These sigma-anti-sigma pairs are all coded by neighboring genes. Interactions between the sigma factor σ^{FliA} (Xac1933) and anti-σ_{FlgM} (Xac1989) were also observed. Xac strains with gene knockouts for several sigma factors were produced. The characterization some these knockout strains point to the involvement of $\sigma^{54}_{Xac1969}$ in the biosynthesis of flagella, participation of $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ in the ability to survive heat shock and involvement of $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ in the response to iron deficiency.

Keywords: *Xanthomonas*, sigma factors, ECF (Extracytoplasmic function), TTSS (Type III secretion system).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando o flagelo polar de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri *(Xac)*..... 20
Figura 2: Doença cancro cítrico causada por *Xanthomonas axonopodis* pv.citri..... 21
Figura 3. Modelo "ziguezague" ilustrando as etapas de desenvolvimento do sistema imunológico da planta durante infecção..... 24
Figura 4: Arquitetura da sequência primária dos fatores σ..... 29
Figura 5: Arquitetura da estrutura primária do fator σ^{54}..... 30
Figura 6: Representação das regiões consensos -24 e -12 reconhecida pelo fator σ^{54}.... 30
Figura 7: Esquema de formação do complexo aberto pela RNA polimerase contendo o fator σ^{54} e as proteínas da família ativadoras do fator σ^{54}..... 31
Figura 8: Mecanismo de regulação dos fatores σ^{ECF}..... 34
Figura 9: Modelo de transporte de citrato de ferro e mecanismo de regulação em *E.coli*..... 37
Figura 10: Mecanismo de transdução de sinal para ativação do fator σ^{E} em resposta a estresses que levam ao desenovelamento de porinas de membrana externa..... 41
Figura 11: Esquema simplificado de representação do flagelo..... 42
Figura 12: Representação esquemática do modelo de regulação dos genes flagelares... 44
Figura 13: Comparações das estruturas dos flagelos e do Sistema de Secreção do tipo III..... 46
Figura 14: Modelo de regulação da cascata de ativação dos genes *hrp*..... 50
Figura 15: Mapa gênico do vetor pOBD e pOAD)..... 56
Figura 16: Mapa do vetor pET28a(+), mostrando e o sítio múltiplo de clonagem (Novagen)..... 66
Figura 17: Esquema representando as regiões flaqueadoras dos genes selecionados para a deleção..... 71
Figura 18: Mapa do vetor suicida pNPTS138 utilizado na produção dos nocautes apolares..... 72
Figura 19: Representação esquemática da seleção das colônias que sofreram a dupla recombinação homóloga..... 74
Figura 20: Mapa do vetor pUFR047..... 75
Figura 21: Ensaio de motilidade realizado com a cepa Δ1969 em meio SB semi sólido 0,5 % agar..... 89
Figura 22: Quantificação da produção de goma xantana, a porcentagem foi feita em relação a cepa selvagem..... 90

Figura 23: (A) Ensaio de motilidade do tipo "swimming" das cepas selvagem, ΔXac1969 e ΔXacFliC realizado em tubos de ensaio de vidro contendo meio XMV2 0,3% agar. (B) Gráfico representando a zona de "swimming", ou seja a distância da motilidade em milímetros (mm). Os dados apresentados são a média de quatro experimentos independentes e o desvio padrão..... 91

Figura 24: Ensaios de patogenicidade da cepa ΔXac1969 realizados em folhas de laranja pêra..... 92

Figura 25: Representação esquemática dos domínios de transmembrana (TM) dos fatores anti-σ identificados em *Xac*..... 94

Figura 26: Alinhamento dos fatores σ^E de E.coli, de P.aeruginosa e seus homólogos mais similares em *Xac* (Xac1319, Xac1682 e Xac1380)..... 97

Figura 27: Teste de patogenicidade da cepa mutante ΔXac1682 realizado em folhas de laranja pêra..... 99

Figura 28: Ensaios de motilidade da cepa ΔXac1682 realizado em meio SB 0,5% ágar..... 99

Figura 29: Investigação da resposta do nocautes do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ a diferentes tipos de estresses..... 101

Figura 30: Comparação da organização gênica do sistema *fecIR fecA* de *E.coli*, *prhIR prhA* de *R.solancearum* e os homólogos em *Xac*..... 103

Figura 31: Alinhamento das regiões 2 dos fatores σ Xac4129 e Xac2191 e seus homólogos PrhI, FecI e PupI..... 104

Figura 32: Representação das estruturas primárias dos fatores anti-σ FecR (*E.coli*), PrhR (*R.solancearum*), Xac4130 e Xac2192 (*Xac*)..... 106

Figura 33: Alinhamento dos fatores anti-sigma Xac2192 e Xac4130 com os homólgos FecR (*E.coli*). e PrhR (*R.solacearum*)..... 107

Figura 34: Representação das estruturas primárias dos receptores dependentes de TonB, FecA (*E.coli*), PrhA (*R.solancearum*), Xac4131 e Xac2193 de (*Xac*)..... 108

Figura 35: Ensaios de duplo-híbrido realizados para confirmar as interações observadas em ensaios de duplo-híbrido utilizando a biblioteca genômicade *Xac*..... 110

Figura 36: Representação esquemática das interações observadas em ensaios de triagem utilizando biblioteca genômica de *Xac*..... 110

Figura 37: Gel de SDS-PAGE representando a purificação da proteína Xac2191..... 111

Figura 38: Gel de SDS-PAGE 18%. Representação das etapas de purificação da região N-terminal de $Xac2192_{1-107}$..... 112

Figura 39: Gel de SDS-PAGE 15%. Representação da indução em larga escala de $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ na cepa BL21(D3)..... 113
Figura 40: Gel de SDS-PAGE 18% que apresenta resultado dos testes de mini indução de $Xac4130_{1-117}$ realizado em diferentes cepas de expressão e em diferentes temperaturas (30ºC e 37ºC)..... 114
Figura 41: Gel de SDS–PAGE 15%. Representação da purificação de Xac4129 em uma coluna de níquel..... 114
Figura 42: *"Far-Western blot"* ou *"overlay"* das proteínas $Xac2191_{6xHis}$-$Xac2192_{1-107}$..... 115
Figura 43: Produtos de PCR gerados à partir do DNA genômico de *Xac* utilizando par de oligonucleotídeos que amplifica a região de 300 pb a jusante do códon de iniciação da tradução para cada uma das proteínas homólogas a PrhJ..... 118
Figura 44: Ensaios de EMSA utilizando as prováveis regiões promotoras dos homólogos a PrhJ de *R.solancearum*..... 119
Figura 45: Fotos do gel de agarose das reações de PCR de colônia para confirmar o nocaute dos genes de interesse..... 120
Figura 46: Teste de patogenicidade das cepas mutantes ΔXac2192, ΔXac4130, ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/ΔXac2191..... 121
Figura 47: Análise por qRT-PCR comparando a expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* na cepa selvagem de *Xac*..... 123
Figura 48: Análise por qRT-PCR comparando a expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* nas cepas tipo selvagem e nas mutantes ΔXac2192 e ΔXac4130..... 124
Figura 49: Análise por qRT-PCR comparando a expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* nas cepas selvagem e nas mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e no duplo mutante ΔXac4129/ΔXac2191.Os RNAs foram extraídos da cepa Wt e mutantes crescida em meio XMV2..... 125
Figura 50: Análise por qRT-PCR comparando as expressões dos genes homólogos a *prhJ* (Xac0136, Xac0898, Xac1229, Xac1970, Xac2168, Xac3421,Xac3480, Xac3993 e Xac4180) nas cepas selvagem e mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191. Os RNAs foram extraídos da cepa Wt e mutantes crescida em meio XMV2..... 126
Figura 51: Teste de patogenicidade realizado com a cepa mutante do gene *hrpG* e com a cepa complementada com o gene *hrpG* no vetor pUFRO47 (ΔhrpG +hrpG) em folhas de laranja pêra..... 127
Figura 52: Gel de agarose. A) Amplificação do fragmento de 1140pb para a clonagem no vetor pUFRO47, B) PCR de colônia para confimar a clonagem na vetor pUFRO47. 128

Figura 53: Análise por qRT-PCR comparando a expressões dos genes *hrpG, hrpX* e *hrcU* nas cepas selvagem e na mutantes ΔhrpG..... 128

Figura 54: Curva de crescimento das cepas de Xac Wt, ΔXac2191(A), ΔXac4129(B) e ΔXac4129/ΔXac2191(C) na carência de ferro..... 131

Figura 55: Análise dos mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191 em resposta ao choque térmico e ao estresse oxidativo..... 132

Figura 56: Curva de crescimento das cepas de Xac Wt, ΔXac2191(C), ΔXac4129(D) e ΔXac4129/ΔXac2191(E) na presença de 1,5% etanol..... 133

Figura 57: Ensaios de motilidade realizado meio SB 0,5% ágar. Xac Wt, ΔXac2191, ΔXac4129, ΔXac4129/ΔXac2191, ΔXac2192 e ΔXac4130..... 134

Figura 58: Modelo de regulação entre o fator sigma FliA e o anti-sigma FlgM..... 138

Figura 59: Modelo de regulação σ^{B} em *B.subtilis*..... 139

Figura 60: Representação esquemática das interações observadas envolvendo o putativo estressomo (Xac 1269/Xac1270/Xac1271 em Xac e a comparação com as interações envolvendo os dois módulos RsbR/RsbT/RsbT e RsbU/RsbV/RsbW conhecidas em *B.subtilis*..... 141

Figura 61: Representação da organização gênica do lócus de 22kbp no genoma de *Xac*, contendo os genes que codificam o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$, o anti-$\sigma_{Xac1681}$ e a serina protease (Xac1680)..... 144

Figura 62: Representação do putativo mecanismo de transdução de sinal que ativa o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$..... 145

Figura 63: Representação da esquemática da via PhoQP de ativação transcricional de *hrpG* e da ativação pós-traducional do regulador de virulência HrpG em *Xanthomonas*..... 157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos utilizados nas clonagens no vetor pOBD..... 55

Tabela 2: Ensaio de auto-ativação para HIS3 e ADE2..... 60

Tabela 3: Lista das proteínas utilizadas como iscas nas triagens de duplo-híbrido, o número de tranformantes obtidos em cada ensaio e o número de clones positivos..... 62

Tabela 4: Lista de oligonucleotídeos utilizados nas clonagens nos vetores pOAD e pOBD para os ensaios de duplo-híbrido e no vetor de expressão pET28a para a expressão das proteínasrecombinantes..... 65

Tabela 5: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a produção dos nocautes.... 71

Tabela 6: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar os fragmentos de 300pb utilizados nos ensaios de EMSA..... 76

Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qRT-PCR..... 80

Tabela 8: Lista dos genes selecionados para os ensaios de duplo-híbrido..... 82

Tabela 9: Resumo das interações obtidas na triagem no sistema duplo-híbrido de levedura utilizando-se as diferentes iscas de interesse..... 84/85

Tabela 10: Lista dos fatores σ^{ECFs} de *Xac* e seus prováveis fatores anti-σ cognatos..... 94

Tabela 11: Proteínas de Xac homólogas a PrhJ de *R. Solanacearum*..... 117

Tabela 12:Relação de similaridade entre os três fatores σ^{ECF} (Xac1319, Xac1682 e Xac1380) de *Xac* e o fator σ^{E} de *E.coli*, *P. aeruginosa*, *X. fastidiosa* e *B. pseudomallei*..... 143

Tabela 13. Proteínas codificadas pelo lócus contendo os genes *Xac1681* e *Xac1682*..... 145

LISTA DE ABREVIATURAS

Xac-Xanthomonas axonopodis pv. citri 306

Xcc-Xanthomonas campestris pv. *campestris*

Xoo-Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*

Wt- tipo selvagem

ECF-fator sigma (função extracitoplasmática)

TTSS-Sistema de secreção do tipo III

hrp–genes resposta hipersensibilidade e patogenicidade

aa-aminoácidos

PCR- reação em cadeia da polimerase

DNA–ácido desoxirribonucléico

dNTPs–dideoxinucleotídeos trifosfato

DO–densidade óptica

kDa–10^3 Dalton

LPS–lipopolissacarídeo

SUMÁRIO

1. Introdução..... 19

1.1 O cancro cítrico e o fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri..... 19
1.1.1 *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac)..... 20
1.2 Sistema imune da planta..... 22
1.3 Processo de transcrição em procariotos e o papel especial dos fatores sigma..... 24
1.4 Classificação dos fatores sigma..... 26
1.4.1 Família do fator σ^{70}..... 27
1.4.2 Família do fator σ^{54}..... 29
1.5 Fatores sigma de funções extracitoplasmáticas (σ^{ECF})..... 33
1.5.1 O fator σ^{FecI} e a captação de ferro..... 35
1.5.2 O papel dos fatores σ^{ECF} na resposta ao estresse..... 39
1.6 Biossíntese de flagelo..... 42
1.7 Sistema de Secreção tipo III (TTSS)..... 44
1.8 Fatores sigma de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri..... 50
2. Objetivos..... 53

3. Materiais e Métodos..... 54

3.1 Clonagem dos genes *Xac3788, Xac1969, Xac2972, Xac3824, Xac2814, Xac0922 Xac1682, Xac1319, Xac1380, Xac3989, Xac4128, Xac2191, Xac2192, Xac4129, Xac4130, Xac1269, Xac1270, Xac1271 e Xac0571* no vetor pOBD..... 54
3.1.1Amplificações dos genes como isca no sistema duplo-híbrido de levedura..... 54
3.2 Transformações de células competentes *E.coli DH10B*..... 56
3.3 Extração de DNA plasmidial em pequena escala..... 57
3.4 Reações de seqüenciamento..... 57
3.5 Identificação de interações proteína-proteína por ensaios de duplo-híbrido em leveduras..... 58
3.6. Teste de auto-ativação com os genes de interesse..... 59
3.7 Transformação em larga-escala da linhagem PJ69-4a com a biblioteca de Xac..... 60
3.8 Extração do DNA plasmidial de levedura em placa..... 63
3.9 Cotransformações dos vetores pOAD e pOBD na levedura PJ69-4a..... 64
3.10 Expressão de proteínas recombinantes..... 65
3.11 Purificações das proteínas recombinantes induzidas em larga escala..... 68

3.12 *Ensaios de "Far-Western blot" ou "Overlay"*..... 69
3.13 Produção dos nocautes não polares..... 70
3.13.1 Produção do fragmento de 2000pb para a clonagem no vetor pNPTS138..... 70
3.14 Transformação em células competentes de *Xanthomonas*..... 72
3.14.1 Preparo de células competentes de *Xanthomonas*..... 72
3.14.2 Transformações das células competentes por eletroporação..... 72
3.15 Seleção dos clones positivos..... 73
3.16 Construção do plasmídeo de expressão do gene *hrpG* em *Xac*..... 74
3.17 Ensaios de mobilidade eletroforética (EMSA)..... 75
3.18 Caracterizações das cepas de *Xac* mutantes..... 76
3.18.1 Teste de patogenicidade em plantas..... 76
3.18.2 Ensaios de motilidade..... 76
3.18.3 Teste de sobrevivência a diferentes estresses (choque térmico, estresse oxidativo e presença de etanol)..... 77
3.18.4 Curva de crescimento em carência de ferro..... 78
3.19 Ensaios de PCR quantitativo em tempo real..... 78
4. Resultados..... 81

4.1 Seleção das proteínas de *Xac* para serem analisadas em ensaios de duplo-híbrido.... 81
4.2 Análises das interações proteína-protéina através dos ensaios de duplo-híbrido de levedura..... 83
4.3 Interação do fator anti-$\sigma_{Xac1989}$ e o fator $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$..... 86
4.4 Interações envolvendo o putativo estressomo RsbRST..... 86
4.5 Caracterizações dos fatores σ^{54} de *Xac*..... 87
4.5.1 Interações envolvendo fatores σ^{54}observadas no sistema duplo-híbrido..... 87
4.5.2 Estudo da relação do fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ na formação de flagelos..... 88
4.5.3 Estudo da relação do fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ na virulência..... 92
4.6 Interações envolvendo fatores sigma da subfamília ECFs..... 92
4.6.1 Interação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2814}$ com o fator anti-$\sigma_{Xac2815}$..... 94
4.6.2 Interação do $\sigma^{ECF}_{Xac3989}$ com o anti-$\sigma_{Xac3988}$, homólogos de PrtI e PrtR..... 95
4.6.3 Interações do $\sigma^{ECF}_{Xac0922}$ com o fator anti-$\sigma_{Xac0921}$..... 96
4.6.4 Interações dos fatores σ^{E} com os fatores anti-σ..... 96
4.6.4.1 Investigação da relação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ com a virulência e motilidade..... 98
4.6.4.2 Investigação da participação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ na resposta aos estresses..... 99
4.6.5. Interações dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ com os fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ respectivamente..... 102
4.6.5.1 A organização genômica e identificações das regiões conservadas dos fatores

$\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$..... 103
4.6.5.2 Identificações dos domínios de transmembrana presentes nos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$..... 104
4.6.5.3 Análise das proteínas sensoras Xac2193 e Xac4131 em comparação com as proteínas FecA de E.coli e PrhA de *R.solancearum*..... 108
4.6.6 Investigações dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ na cascata de ativação do sistema TTSS em *Xac*..... 116
4.6.6.1 Ensaios de EMSA realizado com o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e as regiões promotoras dos possíveis homólogos a *prhJ*..... 116
4.6.6.2 Produção dos nocautes não polares dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$, $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$..... 120
4.6.6.3 Ensaios de patogenicidade realizados em folhas de laranja pêra..... 121
4.6.6.4 Análise das expressões dos genes *hrpG, hrpX, hrcU e* dos homólogos a prhJ *(Xac0136, Xac0898, Xac1229, Xac1970, Xac2168, Xac3421, Xac3480, Xac3993 e Xac4180)* por qRT-PCR..... 122
4.6.6.5 Efeito da mutação dos genes *Xac2192* e *Xac4130* nas expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU*..... 123
4.6.6.6 Efeito das mutações dos genes *Xac2191* e *Xac4129* nas expressões dos genes *hrpG*, *hrpX*, *hrcU* e nos genes homólogos a *prhJ*..... 124
4.7 Efeito da mutação do gene *hrpG* na patogenicidade..... 126
4.8 Caracterizações das cepas mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/ΔXac2191 nas respostas a diferentes estresses..... 129
4.8.1 Crescimento na carência de ferro..... 129
4.8.2 Investigação dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ na resposta ao choque térmico, ao estresse oxidativo e na presença de etanol..... 131
4.8.3 Investigação dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma^{ECF}_{Xac4130}$ no processo de motilidade bacteriana..... 134
5. Discussão..... 135

5.1 Interações dos fatores σ^{ECF} com os fatores anti-σ^{ECF} cognatos..... 135
5.2 Interação envolvendo o fator sigma FliA responsável pela biossíntese de flagelo.... 137
5.3 O papel do putativo estressomo RsbRST em *Xac*..... 138
5.4 O fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ está envolvido na resposta ao choque térmico em *Xac*..... 141
5.5 O fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ está envolvido no mecanismo de formação de flagelo..... 146

5.6 Investigações dos possíveis papéis dos fatores sigma Xac2191 e Xac4129 e dos

fatores anti-sigma Xac2192 e Xac4130 na cascata de ativação do sistema TTSS em *Xac*..... 150
5.7 A participação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ na resposta a carência de ferro..... 157
6-Conclusões..... 161

7-Referências bibliográficas..... 163

8-Anexos

1. Introdução

A citricultura é de grande importância para as atividades agrícolas brasileiras, uma vez que o Brasil é o principal produtor e exportador de suco de laranja, produzindo cerca de 30% da produção mundial de laranjas-doces (Citrus ssp) e 59% da produção global de suco concentrado congelado de laranja (Estanislau *et.al*., 2001). O sistema agroindustrial citrícola nacional movimenta cerca de R$9 bilhões anuais, gerando em torno de 400 mil empregos de forma direta e indireta (Neves *et al*., 2004).

Com o avanço da tecnologia no campo no final do século XIX, as plantas cítricas passaram a ser multiplicadas por enxertia no Brasil, o que trouxe grandes vantagens em termos de precocidade e uniformidades dos pomares. Por outro lado, essa metodologia diminuiu a variabilidade, tornando a cultura de citros um alvo constante às inúmeras pragas e doenças, como por exemplo, as doenças do cancro cítrico, clorose variegada dos *Citrus* (CVC), o "greening", a tristeza e a morte súbita dos citrus.

1.1 O cancro cítrico e o fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

No ano de 1957, o cancro cítrico foi constatado pela primeira vez no Brasil, mais especificamente no município de Presidente Prudente (SP) (Rossetti, 1977). A doença foi posteriormente verificada nos Estados do Paraná (1958), Mato Grosso (1959), Rio Grande do Sul (1980), Santa Catarina (1985), Minas Gerais (1998) e mais recentemente no estado de Roraima (2002) (Nascimento *et. al*., 2003).

Em São Paulo, conseguiu-se evitar até 1979 que a moléstia se alastrasse para a zona citrícola de exportação, utilizando-se de diversas medidas de controle. Em 2005, o cancro cítrico foi identificado em 170.165 plantas do Estado, sendo 7,5% em pomares comerciais. Os sítios e chácaras foram responsáveis por 72% das ocorrências, enquanto que 20,5% foram encontrados em residências urbanas (Boletim Fundecitrus, 2005).

1.1.1 *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*)

O gênero *Xanthomonas* é formado por bactérias Gram-negativas, pertencentes ao grupo Gamma das Proteobactérias. Possui morfologia de bastonete reto, medindo entre 0,2 e 0,6 μm de diâmetro e 0,8 a 2,9 μm de comprimento (Swings & Civerolo, 1993; Moreira *et al*., 2005), respiração aeróbica e motilidade através de um flagelo polar (monotriquia) (Figura 1). A colônia possui um aspecto mucóide de cor amarela, devido à produção do pigmento xanthomonadina e à produção de exopolissacarídeos (Goto & Hyodo, 1985).

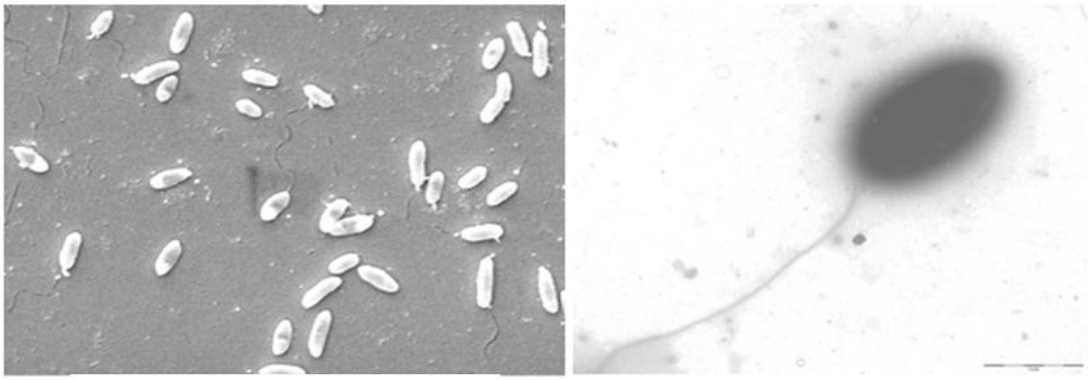


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando o flagelo polar e a morfologia de bastonete reto de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri *(Xac).* Cortesia do Prof. Dr.E.W.Kitajima, NAP/MEPA-ESALQ/USP.

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*) é o agente causador do cancro cítrico. O fitopatógeno penetra no hospedeiro através de aberturas naturais como estômatos, hidatódios e lenticelas ou por ferimentos causados por espinhos, materiais de colheita, máquinas e também pela larva minadora dos citros (LMC) (Gottwald & Graham, 2000). Ao atingir o espaço mesofílico do hospedeiro, ocorre a multiplicação da bactéria nos espaços intercelulares e a produção de exopolissacarídios (EPS), principalmente a goma xantana. Conseqüentemente, há uma diminuição dos espaços intercelulares e um acúmulo de goma xantana, resultando em um aspecto de encharcamento (“water-soaking”) no tecido infectado. O primeiro sintoma visível é a hiperplasia, formada por pequenas manchas amarelas salientes em ambos os lados das folhas, que tornam-se escuras à medida em que os sintomas

progridem. A progressão da doença leva a uma queda da produção de clorofila, caroteno e xantofila na região de encharcamento, formando um halo clorótico (Figura 2A) (Padmanabham *et al*., 1973). Quando a doença atinge um estágio avançado, as lesões nas folhas ficam corticosas (Figura 2B).

Nos frutos, a doença se manifesta com o surgimento de pequenas manchas amarelas com um ponto marrom no centro, podendo ocupar grande parte da casca. As manchas são salientes, com aspecto verrugoso e de cor marrom, sendo que em estágios mais avançados podem romper a casca (Figura 2C). Nos ramos, as lesões são salientes e de cor parda (Figura 2D). A desfolhação e a absição prematura dos frutos ocorrem em plantas altamente infectadas (GOTO *et al*., 1979), provocando danos irreversíveis que comprometem a produtividade.

Figura 2: Doença do cancro cítrico causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. (A) Folhas com lesões circundadas por um halo clorótico. (B) Escurecimento da lesão com aspecto corticoso. (C) Lesões agluninadas no fruto que podem romper a casca. (D) Lesões salentes e de cor parda presente nos ramos. Fonte: http:// www. fundecitrus.com.br/doenças/cancro.html.

A forma de disseminação da bactéria é rápida e não depende de um vetor específico. Um dos maiores agentes disseminadores é o próprio homem, através da circulação indiscriminada de pessoas pelos pomares, materiais de colheitas, veículos, mudas e outros materiais contaminados. Outra forma de disseminação pode ser o vento e a chuva, caracterizando uma disseminação de curta distância, além da larva minadora de citros, *Phyllocnistis citrella*, que ao formar galerias nas folhas, facilita a penetração e o desenvolvimento da bactéria na planta.

Os riscos para o agronegócio decorrente da presença do cancro cítrico são preocupantes e como não existe um controle químico eficaz para a doença, a melhor medida

para eliminar o cancro cítrico é a erradicação das plantas contaminadas. O cancro cítrico é uma doença que possui características fundamentais que torna a forma de erradicação viável e altamente desejável: 1) incapacidade de sobreviver fora da lesão por períodos prolongados; 2) não possuir um vetor de disseminação específico; 3) os sintomas são facilmente identificáveis, o que permite o diagnóstico relativamente rápido; 4) o hospedeiro se restringe a um intervalo perene de árvores frutíferas (GRAHAM *et al.*, 2004).

1.2 Sistema imune das plantas

As plantas, diferentemente dos mamíferos, não possuem células somáticas especializadas de um sistema imune adaptativo. No entanto, possuem um sistema de imunidade inato de cada célula, que permite reconhecer e responder ao patógeno de forma autônoma. Além disso, uma sinalização sistemática pode ser desencadeada em resposta a estímulos microbianos que preparam o tecido nativo para o ataque iminente.

Os padrões moleculares associados aos micróbios ou patógenos (M/PAMPs) são reconhecidos através dos receptores PRRs ("*pattern recognition receptors*") localizados na superfície da célula da planta, responsáveis por desencadear a resposta imune primária (Agrios, 2005; Vivier & Malissen, 2005). A resposta primária induz mudanças na célula vegetal, como o depósito de calose e o acúmulo de proteínas de defesa, como por exemplo quitinases, glucanases e proteases, que afetam a colonização do patógeno (Van Loon, 2006).

O segundo mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas está relacionado com os fatores de virulência. Muitos patógenos desenvolveram mecanismos sofisticados que reprimem o reconhecimento dos M/PAMPS (Martinon & Tschopp, 2005). Muitos patógenos bacterianos possuem um sistema de secreção do tipo III (TTSS), importante para injetar fatores de virulência no interior da célula hospedeira, onde atuam para reprimir a resposta de defesa primária. Como as plantas não possuem um sistema imume adaptativo para eliminar o

patogéno do sistema vascular ou dos espaços intercelulares, elas desenvolveram um mecanismo de defesa que reconhecem os fatores de virulência (efetores) através das proteínas NB-LRR, que possuem domínio de ligação a nucleotídeos (NB "*nucleotide binding"*) e repetições ricas em leucina (LRR *"leucine rich repeat"*). O mecanismo de defesa mediado por proteínas NB-LRR é eficaz contra patógenos que sobrevivem em tecidos vivos (biotróficos), mas não tem efeito em patógenos que matam o tecido do hospedeiro durante a colonização (necrotróficos) (Glazebrook, 2005).

O processo de evolução da interação entre os patógenos e o sistema imune da planta pode ser representado como uma série de adaptações do hospedeiro e do patógeno que tem características de uma corrida armamentista (Figura 3) (Jones & Dangl, 2006). Na primeira fase, os M/PAMPs são reconhecidos pelos receptores PRRs ("*pattern recognition receptors*"), desencadeando a resposta imune mediada por PAMPs (PTI *"PAMP-triggered immunity")*, que impede a colonização do patógeno. Na segunda fase, os patógenos conseguem introduzir efetores no interior da célula, contribuindo para a virulência e interferindo na PTI, resultando assim em proteínas efetoras suscetíveis (ETS *"effector-triggered susceptibility"*). Na terceira fase, um efetor é reconhecido especificamente por uma proteína NB-LRR, resultando na resposta imune desencadeada por efetores ETI (*"effector-triggered immunity"*). Os efetores ETI amplificam e aceleram a resposta PTI, ocasionando a resistência a doenças e, geralmente, desencadeando uma morte celular no local da infecção, chamada de resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, a seleção natural dos patógenos evita a ETI e prioriza sua sobrevivência no hospedeiro, desencadeando a aquisição de efetores adicionais que conseguem suprimir a ETI. Uma nova seleção natural desses efetores adicionais permite um novo desenvolvimento da ETI (Figura 3) (Jones & Dangl, 2006).

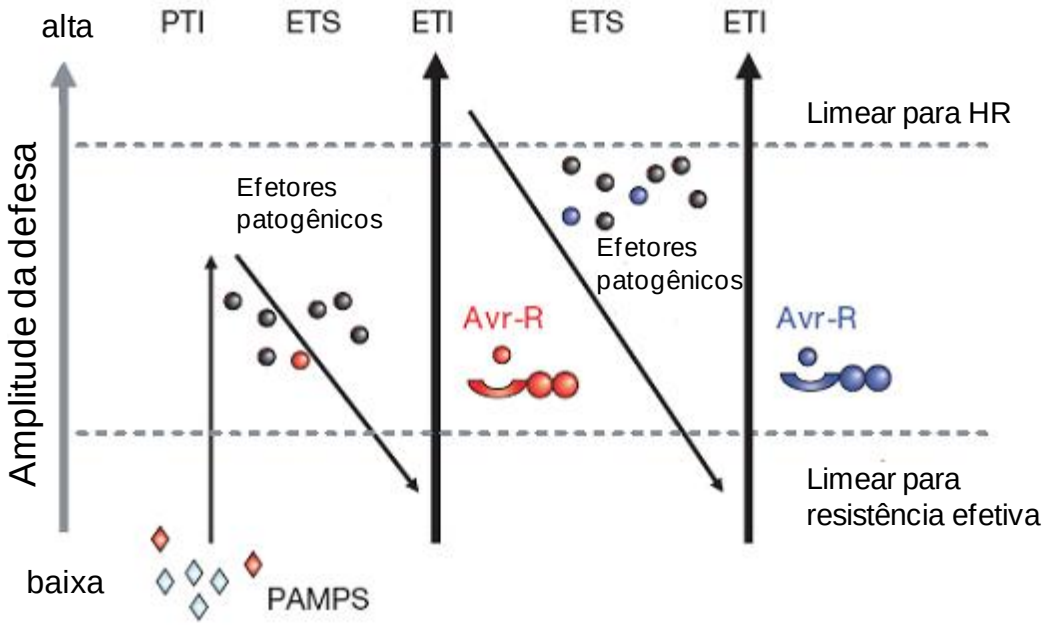


Figura 3. Modelo "ziguezague" ilustrando as etapas de desenvolvimento do sistema imunológico da planta durante infecção. Neste esquema, a amplitude final da resistência da doença ou suscetibilidade é proporcional à [PTI-ETS+ETI]. Na primeira fase, as plantas detectam a população microbiana (PAMPs, diamantes vermelhos), desencadeando uma resposta de imunidade (PTI). Na segunda fase, patógenos entregam com sucesso efetores que interferem com a PTI, desencadeando a susceptibilidade por efetores (ETS). Na terceira fase, um efetor (indicado na figura em vermelho, Avr) é reconhecido pelas proteínas NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão ampliada de PTI que muitas vezes induz a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, novos efetores surgem através do fluxo horizontal de genes (em azul), ajudando os patógenos a suprimir a ETI. A seleção por parte das plantas de novos alelos de proteínas NB-LRR, que podem reconhecer um dos efetores recém adquiridos, dispara novamente a ETI. Fonte: Jones e Dangl, 2006.

1.3 Processo de transcrição em procariotos e o papel especial dos fatores sigma

Em procariotos, ao contrário do que ocorre em organismos eucariontes, uma única RNA polimerase é responsável pela síntese de mRNAs, rRNAs e tRNAs. A RNA polimerase é uma das maiores proteínas bacterianas, sendo formada por duas subunidades α, uma subunidade β, uma subunidade β' e uma subunidade σ, também chamada fator sigma. As subunidades alfa, beta e beta' são produtos dos genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, respectivamente, e formam o núcleo da RNA polimerase, também chamada de apoenzima (Archambault & Friesen, 1993; Cramer *et al*., 2001). Esse por sua vez tem a capacidade de sintetizar RNA a

partir de um molde de DNA, mas é incapaz de iniciar a transcrição nos sítios apropriados, pois não é capaz de distinguir entre promotores e outras sequências de DNA.

A RNA polimerase completa, conhecida como holoenzima, inclui o fator sigma, responsável pelo reconhecimento do DNA com alta afinidade nas regiões promotoras dos genes a serem transcritos, formando um complexo binário fechado e estável (holoenzima/DNA) (Gross *et al*., 1998). Bactérias utilizam um fator σ^{70} para a transcrição da maioria dos genes, mas também possuem fatores σ alternativos para expressão de genes específicos em condições especiais.

Na maioria dos casos estudados, as taxas com que os genes são transcritos variam diretamente com a taxa com que seus promotores formam complexos de iniciação estáveis com a holoenzima RNA polimerase. Uma análise das sequências de 300 promotores de *E. coli* reconhecidos pelo fator σ^{70}, identificou duas regiões consenso importantes nas posições -10 (TATAAT) e -35 (TTGACA) do início da transcrição, separados por 15-19 nucleotídeos, como sendo as regiões de reconhecimento dos fatores sigma (Hawley & McClure, 1983; Harley & Reymolds, 1987).

Após a formação do complexo fechado, a holoenzima promove a abertura local da dupla hélice (bolha), através do rompimento das pontes de hidrogênio e a exposição de cerca de 17 pares de bases do promotor. Na região consenso -10 predominam nucleotídeos de adenina e timina, o que facilita a formação do complexo aberto com a RNA polimerase articulada corretamente à fita que será utilizada como molde. Após a formação da ligação fosfodiéster entre dois ribonucleotídeos trifosfatos complementares às bases expostas na fita molde, a enzima move-se e dissocia-se da região promotora, abrindo a dupla hélice mais à frente e expondo novos nucleotídeos. Este movimento é acompanhado pela liberação do fator σ através de uma mudança conformacional no núcleo enzimático da RNA polimerase, tornando-a apta a promover o elongamento da cadeia. A dissociação do fator σ é fundamental

para que ocorra processo de elongamento da cadeia, caso contrário, a enzima permaneceria fortemente ligada ao promotor e não poderia deslocar-se sobre o DNA (Travers *et al.*, 1973; Chamberlim, 1974).

O início da transcrição é o passo mais importante para a regulação da expressão gênica em bactéria. A transcrição pode ser regulada por fatores transcricionais ativadores ou repressores, que se ligam na região promotora, pelo próprio promotor, através de variações da sequência consenso, por pequenos ligantes e também pela estrutura do cromossomo (Browning & Busby, 2004). Um exemplo de um pequeno ligante que afeta a iniciação da transcrição é o guanosina tetrafosfato (ppGpp), que é rapidamente sintetizada em resposta a estresse nutricional. O ppGpp se liga a RNA polimerase nos sítios que incluem o N-terminal da subunidade β´ e o C-terminal da subunidade β (Toulokhonov *et al*., 2001). O mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, porém sabe-se que o ppGpp pode desestabilizar o complexo aberto (Baker *et al*., 2001), pode competir com a ligação de NTPs ou pode mudar a afinidade da apoenzima para fatores sigma diferentes (Jores & Wagner, 2003). Outra forma de regulação gênica ocorre através da inibição do fator σ por um fator anti-σ cognato que impede que o fator σ reconheça o núcleo da RNA polimerase, resultando na inibição de um conjunto de promotores.

1.4 Classificação dos fatores sigma

A maioria das espécies bacterianas sintetiza um fator sigma principal (σ^{70}) e outros fatores sigma alternativos, os quais reconhecem diferentes seqüências consenso do DNA em famílias de promotores específicos. Esses fatores tornam-se ativos ou tem sua concentração na célula aumentada em resposta à variações ambientais, competindo com o fator σ principal pelo núcleo da RNA polimerase (Gruber & Gross, 2003). Logo, cada fator σ pode direcionar a RNA polimerase a uma classe específica de seqüências promotoras, proporcionando à

bactéria a oportunidade de manutenção basal da sua expressão gênica, assim como sua regulação em resposta a alterações ambientais e a sinais durante o desenvolvimento. Baseados na similaridade entre as suas seqüências primárias, os fatores σ podem ser agrupados em duas famílias: os fatores σ^{70} e os fatores σ^{54} (Wosten, 1998).

1.4.1 Família do fator σ^{70}

A família do fator σ^{70} foi subdividida em grupos de acordo com as características filogenéticas (Lonetto *et al*., 1992; Wosten, 1998). O grupo 1 é formado pelos fatores sigma primários, presentes em todas as bactérias. Eles são responsáveis pela transcrição da maioria dos genes que são essenciais para a sobrevivência celular. O fator σ primário em *E.coli* é codificado pelo gene *rpoD*, conhecido como fator σ^{70}, enquanto que em bactérias Gram-positivas, este fator sigma é conhecido como σ^{A} (Wosten, 1998). O grupo 2 compreende os fatores sigma da família σ^{70} com seqüências similares aos fatores do grupo 1, mas que não são essenciais para o crescimento da célula, como por exemplo, os fatores σ^{S} de *E.coli* e σ^{B} de *B.subtilis*, responsáveis pela resposta ao estresse. O grupo 3 compreende fatores sigma alternativos, que diferem significativamente na seqüência de aminoácidos em relação aos fatores sigma primários. Este grupo inclui também os fatores sigma que controlam a expressão de genes responsáveis pela biossíntese de flagelo, pela resposta ao choque térmico e pela esporulação. Os membros do grupo 4, chamado de ECFs (fatores sigma de funções extracitoplasmáticas) possuem baixa similaridade de sequência em relação aos demais grupos da família σ^{70} e estão envolvidos na resposta a sinais extracitoplasmáticos.

Através de uma análise comparativa das sequencias das proteínas da família σ^{70} em diferentes bactérias foi possível identificar quatro regiões conservadas (Helmann & Charberlin, 1998), que por sua vez foram subdivididas em subregiões (Figura 4) (Lonetto *et al*., 1992) A subregião 1.1 é bastante variável e está presente apenas nos fatores sigma

primários, atuando como um domínio inibitório que impede a ligação do fator σ livre ao promotor reconhecido por ele, além de modular a ligação ao DNA e regular a formação do complexo aberto, podendo assim induzir ou inibir um processo importante para o início da transcrição (Wilson & Dombroski, 1997; Vuthoori *et al*., 2001). A presença dessa região somente nos fatores sigma primários provavelmente é devido à necessidade de uma regulação mais rígida, uma vez que esses fatores estão em concentrações mais elevadas no citoplasma em relação aos demais fatores sigma e assim podem competir melhor para a apoenzima. Os fatores sigma primários reconhecem um maior número de promotores e a subregião 1.1 presente nos mesmos pode proporcionar uma maior flexibilidade no reconhecimento de promotores distintos (Vuthoori *et al*, 2001).

A subregião 1.2 auxilia na formação do complexo aberto e no deslizamento da RNA polimerase sobre o mesmo (Wilson & Dombroski, 1997) e está presente em todos fatores sigma, com exceção da subfamília ECF (Wosten, 1998). A região NCR, localizada entre as regiões 1 e 2, é bastante divergente e está presente somente nos fatores sigma primários. A sua função é desconhecida, embora existam evidências de que a NCR tem um papel na ligação com o núcleo da RNA polimerase (Vassylyev *et al*., 2002)

A região 2 é a mais conservada e está presente em todos os fatores sigma, sendo dividida em 4 subregiões (Lonetto *et al*., 1992). A região 2.1 possui resíduos para a interação com o núcleo da RNA polimerase, a região 2.3 atua na ligação ao DNA e na sua desnaturação, enquanto que a região 2.4 reconhece a região -10 do promotor (Aiyar *et al*., 1994; Rong & Helmann, 1994).

A região 3 possui três subregiões e está presente nos fatores sigma ECFs (Lonetto *et al*., 1992). A região 3.0 reconhece as regiões -14 e -15 do promotor e as regiões 3.1 e 3.2 estão envolvidas na ligação ao DNA e ao núcleo da RNA polimerase, respectivamente (Barne *et al*., 1997; Bown *et al*., 1997; Voskuil & Chambliss, 2002)

A região 4 está presente em todos os fatores sigma da família σ^{70} e possui duas subregiões. A subregião 4.1 é responsável pela interação com ativadores transcricionais e a subregião 4.2 reconhece a região -35 do promotor (Sharp *et al*., 1999; Ross *et al*., 1993).

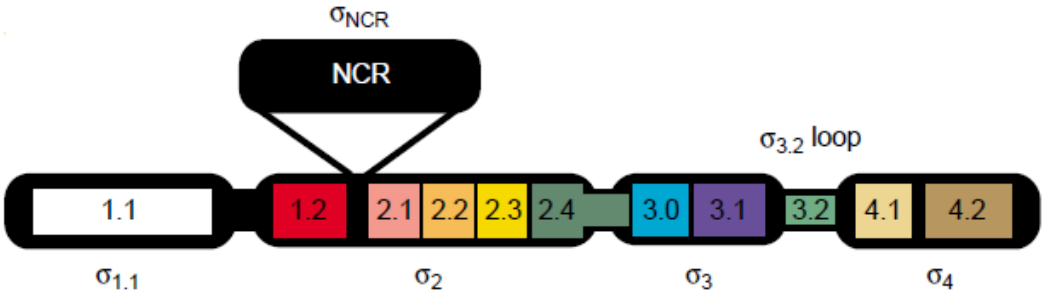


Figura 4: Arquitetura da sequência primária dos fatores σ. A região 1.1, apresentada em branco, é a menos conservada. As regiões altamente conservadas σ_2 e σ_3 estão representadas em cores. A região 4 presente em todos os fatores σ está representada em bege para a subregião 4.1 e em marrom para a 4.2. A região NCR presente somente nos fatores σ primários está destacada em preto (Murakami & Darst, 2003)

1.4.2 Família do fator σ^{54}

A família do fator σ^{54} é estrutural e funcionalmente distinta da família do fator σ^{70}. Baseado na homologia entre as proteínas σ^{54}, três regiões diferentes podem ser destacadas (Figura 5): A região I, rica em glutamina, que compreende os aminoácidos 1 ao 56; região II, mais variável e rica em aminoácidos ácidos, que compreende os aminoácidos de 60 a 120 e a região III, também chamada de C-terminal, que contém 400 aminoácidos e possui a região de ligação ao DNA que consiste de dois motivos conservados, um domínio HTH (hélice-volta-hélice) e um "box rpoN", ambos envolvidos no reconhecimento de regiões promotoras distintas (Taylor *et al*, 1996).

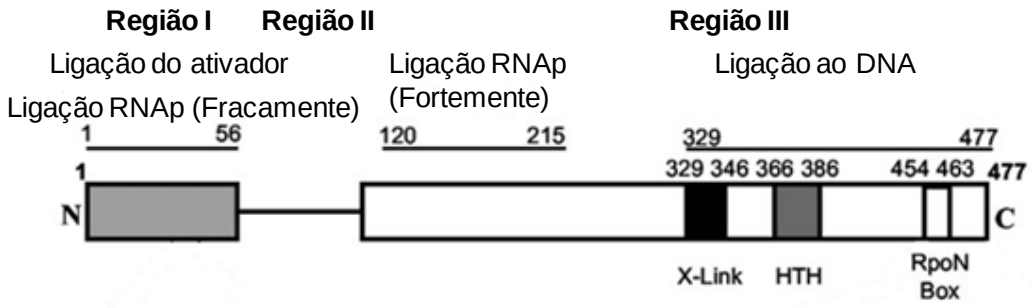


Figura 5: Arquitetura da estrutura primária do fator σ^{54}. Os domínios e os motivos envolvidos nas interações com o DNA, núcleo da RNA polimerase e a proteína ativadora estão indicados na figura. Na região III estão em destaque os resíduos importantes para a interação com o DNA: X-link, hélice-volta-hélice (HTH) e boxe RpoN (Burrows *et al*., 2003). RNAp: RNA polimerase.

A RNA polimerase associada ao σ^{54} reconhece promotores com regiões conservadas nas posições -24 (região GG) e -12 (região GC), juntamente ao sítio de início da transcrição (Figura 6) (Burrows *et al*., 2003).

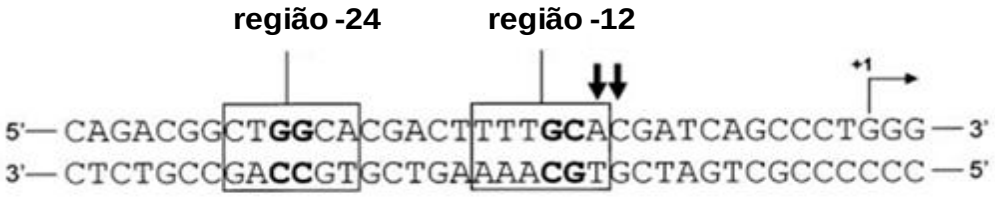


Figura 6: Representação das regiões consensos -24 e -12 reconhecida pelo fator σ^{54} (Burrows *et al*., 2003).

A iniciação da transcrição da holoenzima da RNA polimerase associada ao σ^{54} difere da família do σ^{70}. Enquanto a RNA polimerase contendo σ^{70} pode iniciar a transcrição na ausência de ativadores transcricionais, a transcrição de todos os promotores dependentes do σ^{54} requer a presença de uma proteína ativadora que se liga a uma região de aproximadamente 100 pb ou mais localizada a montante do início da transcrição (Morris *et*

al, 1994). Para aproximar a proteína ativadora do complexo RNA polimerase associada ao fator σ^{54} é necessária a curvatura do DNA entre os dois, formando um laço. Ao associar-se à RNA polimerase contendo o fator σ^{54}, as proteínas ativadoras, pertencentes a família de ATPases AAA (ATPases associadas a várias atividades celulares), hidrolizam ATP, ocasionando mudanças conformacionais que são associadas à transição entre o complexo fechado e o complexo aberto (Figura 7), permitindo o início da transcrição (Buck *et al*., 2000; Zhang *et al*., 2002).

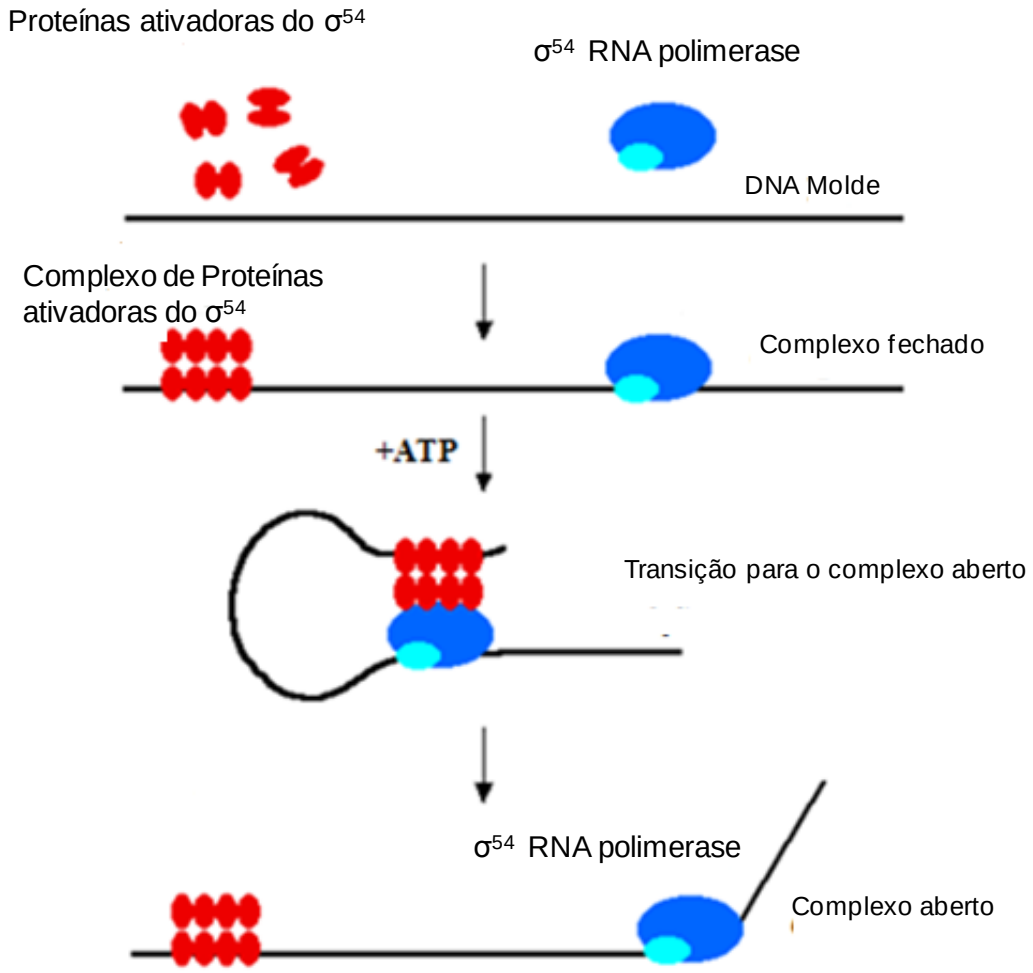


Figura 7: Esquema de formação do complexo aberto pela RNA polimerase contendo o fator σ^{54}. Proteínas da família ativadoras do fator σ^{54} na forma de dímeros se ligam na região a montante do início transcrição do promotor reconhecido pela RNA polimerase contendo o fator σ^{54}, formando um complexo de proteínas ativadoras. Na presença de ATP ocorre a interação entre esse complexo e o complexo fechado, através da formação de uma alça no DNA. Mudanças conformacionais ocasionam a abertura do complexo (Kustu *et al*, 1991, modificado).

A família de ativadores de fatores σ^{54} é composta por proteínas que compartilham uma organização estrutural semelhante, contendo geralmente três domínios: a região C-terminal, que contém o motivo HTH (hélice-volta-hélice) de ligação ao DNA; a região central, responsável pela interação com o fator σ^{54}, sendo a região mais conservada da proteína e a região N-terminal, composta por um domínio sensor que varia entre as diferentes proteínas ativadoras e geralmente regula a atividade ATPásica do domínio central (Studholme & Dixon, 2003).

As diferenças na arquitetura da região N-terminal das proteínas ativadoras do fator σ^{54} estão relacionadas com a forma e o mecanismo como elas atuam. As proteínas ativadoras que possuem um domínio sensor regulador de resposta (CheY-like domain) são ativadas através da fosforilação de um resíduo de aspartato presente na região N-terminal por uma histidina quinase. Outros ativadores possuem um domínio sensor da família PRD, que pode ser ativado por fosforilação através do sistema de fosfotransferase dependente de fosfoenol-piruvato (PTS). Já outros ativadores usam domínios PAS, GAF e V4R como sensores de fatores ambientais (Studholme & Dixon, 2003).

O fator σ^{54} foi descoberto em estudos sobre a expressão da glutamina sintetase e a assimilação de nitrogênio em enterobactérias (Hunt & Magasanik, 1995). Estudos realizados posteriormente confirmaram o papel do σ^{54} na assimilação de nitrogênio e também seu envolvimento em outras funções, incluindo resposta a carência de fonte de carbono, processos fermentativos, biossíntese de flagelo e na virulência (Kustu *et al*., 1989; Studholme & Buck, 2000).

1.5 Fatores sigma de funções extracitoplasmáticas (σ^{ECF})

As bactérias vivem em um ambiente que sofre constantes mudanças, por isso, a alteração da expressão de proteínas na superfície celular é essencial para a adaptação e a sobrevivência do organismo. As mudanças ambientais incluem osmolaridade, pressão (Chi & Bartlett, 1995), fatores ambientais que afeta a composição da membrana (Missiakas *et al.*, 1996), luz (Gorham *et al.*, 1996), temperatura (Erickson & Cross, 1989) e concentração de nutrientes e micronutrientes (Missiakas & Raina, 1998).

Uma variedade de mecanismos é utilizada para sinalizar condições extracitoplasmáticas para o citoplasma. Uma importante classe de mecanismos envolve a ativação de fatores sigma específicos (σ^{ECF}), que por sua vez recrutam a RNA polimerase para ativar a transcrição de genes com a finalidade de expressar proteínas apropriadas para uma determinada resposta. Além disso, foram descritos muitos casos em que fatores σ^{ECF} controlam a expressão de genes relacionados à virulência. Em *Mycobacterium tuberculosis*, a letalidade em camundongos depende do fator ECF σ^{C}, enquanto que em *Salmonella typhimirium*, a virulência depende do fator σ^{E}. Em *Pseudomonas aeruginosa* , o fator σ^{AlgU} protege a bactéria de antibióticos, estresse oxidativo e da resposta imune do hospedeiro. Alguns patógenos expressam genes relacionados à virulência em condições de carência de ferro. Em *Pseudomonas aeruginosa*, o sideróforo (PvdA), que ajuda na captação de ferro, depende do fator sigma PvdS.

Os fatores σ^{ECF} respondem a sinais do meio extracitoplasmático por um mecanismo de transdução de sinal conservado (Figura 8). Vários σ^{ECF} são co-transcritos com um fator anti-σ cognato, uma proteína de membrana interna. A maioria dos fatores anti-σ possui um domínio N-ternimal citoplasmático e o domínio C-terminal periplasmático separados por um segmento de domínio transmembrana (Hughes & Mathee, 1998). De um modo geral, na ausência do sinal extracitoplasmático, o σ^{ECF} se encontra inativado, através da interação com um fator

anti-σ cognato. Esses sinais extracitoplasmáticos específicos são reconhecidos pelo domínio C-terminal do anti-σ, resultando na sua ativação e conseqüente liberação do fator σ^{ECF}. O σ^{ECF} liberado, em conjunto com o núcleo da RNA polimerase, ativa a transcrição dos genes relacionados à resposta ao sinal transmitido (Figura 8) (Raivio & Silhavy, 2001).

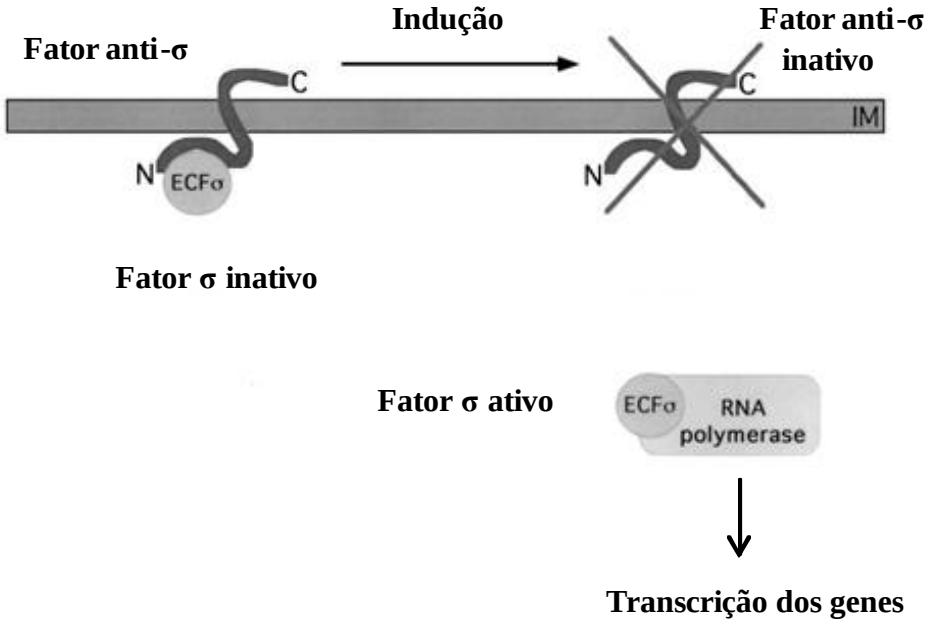


Figura 8: Mecanismo de regulação dos fatores σ^{ECF}. Na ausência do sinal, o fator σ está ligado ao fator anti-σ localizado na membrana interna. Na presença de um sinal extracitoplasmático o fator anti-σ é inativado, liberando o fator σ para interação com o núcleo da RNA polimerase, ativando, portanto, a transcrição dos genes (Raivio & Silhavy, 2001).

Os fatores anti-σ podem ser inativados por três mecanismos diferentes: 1) a eliminação do fator anti-σ por secreção celular, mecanismo que será descrito na secção 1.6, sobre biossíntese de flagelo; 2) degradação por protease, processo descrito na secção 1.5.2, sobre controle do fator σ^{E} através de DegS e YaeL; 3) através da interação com um fator anti-anti-σ que tem como função inibir a atividade do fator anti-σ através da interação proteína-proteína. Em alguns sistemas, a afinidade entre fator anti-anti-σ e o anti-σ é regulada pela estado de

fosforilação. Estes tipos de mecanismos ocorrem, por exemplo, no controle da esporulação e no controle de resposta a fatores estressantes em *B. subtillis* (Perego, 1998).

1.5.1 O fator σ^{FecI} e a captação de ferro

O ferro é um cofator de muitas enzimas com atividade redox e a maioria das bactérias necessita de quantidades micromolares desse elemento para o crescimento normal (Guerinot, 1994). No entanto, a quantidade de ferro livre disponível é muito baixa no ambiente terrestre e aquático, devido à rápida oxidação de produtos ferrosos (Fe^{2+}) para íons férricos (Fe^{3+}), na forma de hidróxidos (Ratledge & Dover, 2000). Em eucariotos superiores existem quantidades substanciais de ferro, no entanto, o metal se encontra fortemente associado a proteínas de transporte e de armazenamento de ferro, não sendo disponível na forma livre para as bactérias parasitas. Conseqüentemente, o nível de ferro livre nos fluídos biológicos é estimado ser de 10^{-18}M (Griffiths, 1978; Wienk *et al*., 1999). Dessa forma, as bactérias desenvolveram uma série de estratégias que garante às mesmas adquirir o ferro do ambiente através da redução de íons férricos para ferrosos, além de obter o metal diretamente das proteínas que carregam ferro do hospedeiro e captá-lo através de sideróforos.

A captação de ferro mediada por sideróforos é a forma mais comum de aquisição de ferro entre as bactérias. Os sideróforos são importantes para a sobrevivência e crescimento desses organismos no solo e em ambientes aquosos (Guerinot, 1994) e são essenciais para a virulência de muitos patógenos (Ratledge & Dover, 2000). Sistemas para a captação de ferro mediada por sideróforos foram descritos em bactérias Gram-negativas, embora bactérias Gram-positivas, como *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Streptomyces*, também possuem sistemas de captação de ferro por sideróforos.

A regulação da síntese de sideróforos ocorre através da proteína Fur, que requer íons ferro (Fe^{2+}) como cofator para dimerizar e se ligar ao DNA. O complexo Fur-Fe^{2+}se liga a

uma região especifica do promotor chamada fur-box e inativa a transcrição de genes relacionados com a captação de ferro. Em situações de carência de ferro, a apo-Fur é incapaz de se ligar ao DNA, permitindo assim a transcrição dos genes envolvidos no mecanismo de captação de ferro (Hantke, 2001; Panina *et al*., 2001). A proteína Fur foi o primeiro regulador da síntese de sideróforos descrito, mas não é o único. Em muitas espécies bacterianas, a expressão dos genes de captação de ferro depende de ativadores transcricionais (Crossa *et al*., 1997).

Outra forma de regulação da síntese de sideróforos e dos genes relacionados com a captação de ferro envolve fatores σ da subfamília ECF, mecanismo que permite à bactéria responder a determinados sideróforos e à disponibilidade de ferro do ambiente. Em *E.coli*, o fator σ^{FecI} regula a expressão do sistema de transporte de citrato de ferro (Fe^{3+}) (sistema Fec). A atividade de FecI é regulada por FecA e FecR. FecA é uma proteína de membrana externa que recebe o sinal extracitoplasmático (presença de Fe^{3+} na forma de citrato) e transmite esse sinal para o periplasma. A região N-terminal de FecA é importante para a sinalização de FecR, um fator anti-σ de membrana citoplasmática que transmite o sinal para o citoplasma e regula a atividade de FecI (Figura 9) (Braun *et al*., 2003).

FecA pertence à família de transportadores dependentes de TonB. A ligação da membrana externa e do citoplasma está acoplada ao conjunto de proteínas TonB, ExbB e ExbD. A proteína TonB ativa a proteína transportadora através da ligação de um heptapeptídeo presente na região C-terminal de TonB e um motivo de ligação de TonB (TonB Box) presente na região N-terminal de FecA (Figura 9) (Braun *et al*., 2005).

O fator σ^{FecI} regula a transcrição dos genes transportadores de citrato de ferro *fecABCD* em *E.coli.* Os genes reguladores *fecIR* estão localizados no genoma à montante dos genes *fecABCDE*, formando outra unidade transcricional (Braun, 1997). Os genes *fecBCDE*

codificam um complexo ABC de transporte associado à membrana citoplasmática. As transcrições de *fecIR* e *fecABCDE* são reguladas pela proteína Fur (Figura 9).

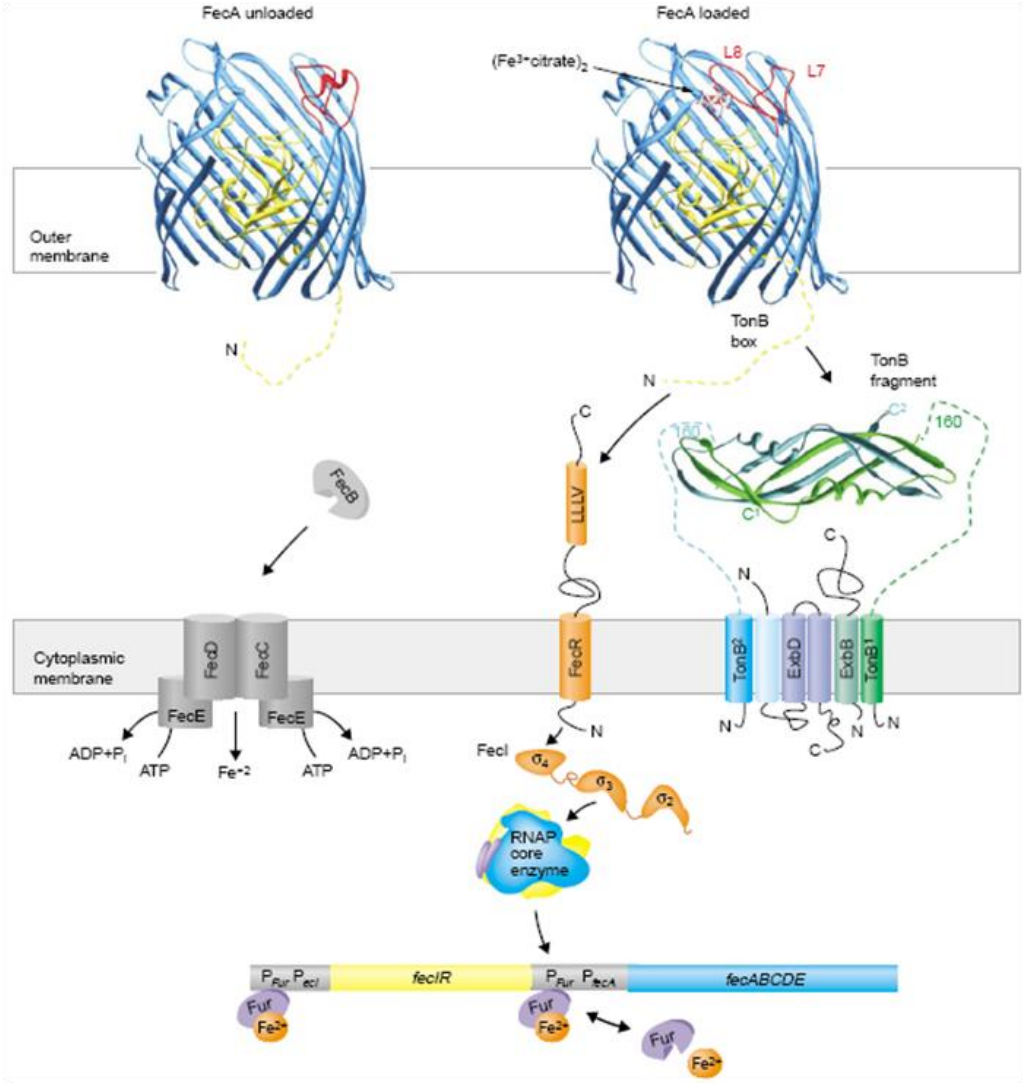


Figura 9: Modelo de transporte de citrato de ferro e mecanismo de regulação em *E.coli*. Mudanças estruturais que ocorrem nos "loops" 7 e 8 de FecA após a ligação do citrato férrico capturam o citrato férrico na cavidade de FecA. A região Box TonB no N-terminal de FecA interage com o fragmento periplasmático de TonB. A topologia do sistema de transdução de energia TonB-ExbB-ExbD é mostrada na membrana citoplasmática. A figura representa as interações da região N-terminal de FecA com o domínio chamado motivo de leucina (LLLV) presente na região C-terminal de FecR, a interação do N-terminal de FecR com a região 4 de FecI e também a interação da região 3 de FecI com o núcleo da RNA polimerase. A ativação da transcrição dos genes *fecABCDE* ocorre em baixos níveis de Fe^{2+}, que resulta na dissociação da apo-Fur do Fur-boxe (P_{fur}). O esquema de transporte de ferro por FecBCDE é mostrado ao lado esquerdo da figura (Braun *et al*., 2003).

O fator σ^{FecI} direciona o núcleo da RNA polimerase para o promotor dos genes *fecABCDE.* A atividade de FecI é controlada por FecR, que protege FecI da degradação e da ação de protease, mantendo-o estável. Na ausência de FecR praticamente não há transcrição dos genes *fecABCDE* (Braun *et al*, 2003). Células mutantes que contêm apenas a região N-terminal de $FecR_{1-87}$ apresentam transcrição constitutiva dos genes *fecABCDE,* e as células que contém uma porção maior do FecR, não contendo a região de interação com FecA, também apresentam transcrição constitutiva dos genes *fecABCDE*, porém, mais fraca (Braun, 1997; Enz *et al*., 2000). Quando o sinal da presença de citrato de ferro (Fe^{3+}) é percebido por FecA e transmitido para FecR, ocorre uma mudança conformacional em FecR e conseqüente liberação de FecI para associar-se imediatamente ao núcleo da RNA polimerase. Nesse modelo, o FecR atua tanto como uma chaperona quanto como fator anti-σ, uma vez que FecI é mantido na forma inativa mas estável quando ligado ao FecR e torna-se ativo ao ser liberado (Enz *et al*, 2000).

O mecanismo de regulação da transcrição do sistema Fec foi descrito em outras espécies. Em *Pseudomonas pudita,* a expressão do transportador de ferro ocorre através do sideróforo pseudobactina, que induz a síntese de um transportador de membrana externa (Lamont *et al*., 2002). Dois receptores de pseudobactina foram caracterizados, o receptor PupA de pseudobactina nativa 358 (Bitter *et al*., 1991) e o receptor PupB de dois tipos de pseudobactina, BN8 e BN7 (Koster *et al*., 1993; Koster *et al*., 1994). Dois genes *pupI* e *pupR* estão localizados a montante do gene *pupB* e a indução da transcrição de *pupB* por pseudobactina depende de *pupI* e *pupR. PupI* e *pupR* apresentam, respectivamente, 42,8% e 36,6% de identidade ao *fecI* e *fecR* de *E.coli.* Apesar da semelhança do mecanismo de regulação da transcrição de *pupB* ao sistema *fecABCDE,* PupR funciona apenas como um fator anti-σ, uma vez que na ausência de PupR, a expressão de *pupB* é constitutiva.

Em *Pseudomanas aeruginosa,* a síntese do sideróforo pioverdina e o transporte da pioverdina férrica são controlados pelo sistema análogo ao FecIR. A pioverdina férrica funciona como um indutor de pioverdina e também como um ativador dos genes transportadores de pioverdina férrica, além de induzir a produção da exotoxina A e de endoproteinase extracelular (PrpL) (Wildermam *et al*., 2001). O complexo pioverdina férrica é internalizado via proteína de membrana externa FpvA, um receptor dependente de TonB (Poole *et al*., 1993). A ligação da pioverdina férrica a FpvA induz um sinal que é transmitido via membrana citoplasmática através do fator anti-σ FpvR para o fator σ^{PvdS} (Lamont *et al.*, 2002). O fator σ^{PvdS} se liga ao núcleo da RNA polimerase ativando a transcrição dos genes relacionados.

Sistemas análogos ao FecAIR também foram identificados em *Bordetella pertussis* (VanderpooL & Armstrong, 2001), *B. bronchiseptica* (Pradel & Locht, 2001) e *B. avium* (Kirby *et al*., 2001). *B. pertussis* e *B. bronchiseptica* codificam dois genes reguladores *hurI* e *hurR* localizados à montante do conjunto de genes *bhuRSTUV*. A síntese de um possível transportador de sideróforos férrico de membrana externa (BfrZ) em *B.bronchiseptica* é regulada por duas proteínas, BupI e BupR, que são homólogas a FecI e FecR, respectivamente. *B. avium* possui um sistema de utilização do grupo heme onde a síntese da BhuR, proteína de membrana externa relacionada ao transporte, é induzida na presença do grupo heme e necessita do fator σ RhuI (Kirby *et al*., 2001).

1.5.2 O papel dos fatores σ^{ECF} na resposta ao estresse

O envelope celular das bactérias está sujeito a várias pertubações ambientais que necessitam ser controladas para manter a integridade da célula. Em bactérias Gram-negativas, a resposta ao estresse extracitoplasmático necessita de uma via de transdução de sinal

intercompartimental, uma vez que os fatores de transcrição necessários para a resposta estão localizados no citoplasma (Raivio, 2005).

Estudos realizados em *E.coli* monstraram que o fator σ^E é responsável por respostas à estresses extracitoplasmáticos como choque térmico e presença de etanol (Mecsas *et al*., 1993; Missiakas *et al*., 1996). O fator σ^E foi caracterizado como um regulador global da adaptação ao estresse extracitoplasmático e virulência em *E.coli*, *P. aerunginosa* e outras bactérias (Helmann, 2002). O fator σ^E de *P.aerunginosa* (também conhecido como AlgU) foi identificado como um regulador do fator σ^H, relacionado à resposta ao choque térmico e responsável pela síntese do exopolissacarídeo alginato (Govan & Deretic, 1996; Firoved *et al*., 2002; Firoved & Deretic, 2003). O fator σ^E também tem sido descrito como um regulador de muitos outros genes, como os relacionados com adesão, genes que codificam proteínas de membrana, transportadores, proteases e enzimas metabólicas (Firoved *et al*., 2002; Firoved & Deretic, 2003). Em *P. fluorescens*, o fator σ^E foi descrito ser importante para a resposta ao estresse osmótico e por dessecação (Schnider-Keel *et al*., 2001). Em *Salmonella entérica*, o fator σ^E está envolvido na resposta ao estresse oxidativo, pH ácido, choque térmico e carência de carbono.

A via de transdução de sinal que ativa o fator σ^E em resposta a porinas de membrana externa desenoveladas envolve um fator anti-σ (RseA), uma proteína periplasmática (RseB) e as proteases DegS e YaeL (RseP) (Figura 10). As proteínas RseA e RseB são codificadas no operon *rpoE-rseABC* dependente do fator σ^E e são autoreguladas pelo σ^E (Missiakas *et al*., 1997). Na ausência do estresse, o fator anti-σ (RseA) mantém o fator σ^E inativo. Na presença do choque térmico e na presença de porinas, a quantidade de RseA é reduzida drasticamente devido à ação das proteases DegS e YaeL. O domínio PDZ de DegS interage com porinas desenoveladas, ativando a função proteolítoca de DegS e YaeL, que cliva o sítio periplasmático de RseA e o sítio intramembrana, respectivamente, liberando o σ^E para

associar-se ao núcleo da RNA polimerase e transcrever os genes do seu regulon (Figura 10) (Ades, 2004; Alba & Cross, 2004; Rowley *et al*., 2006).

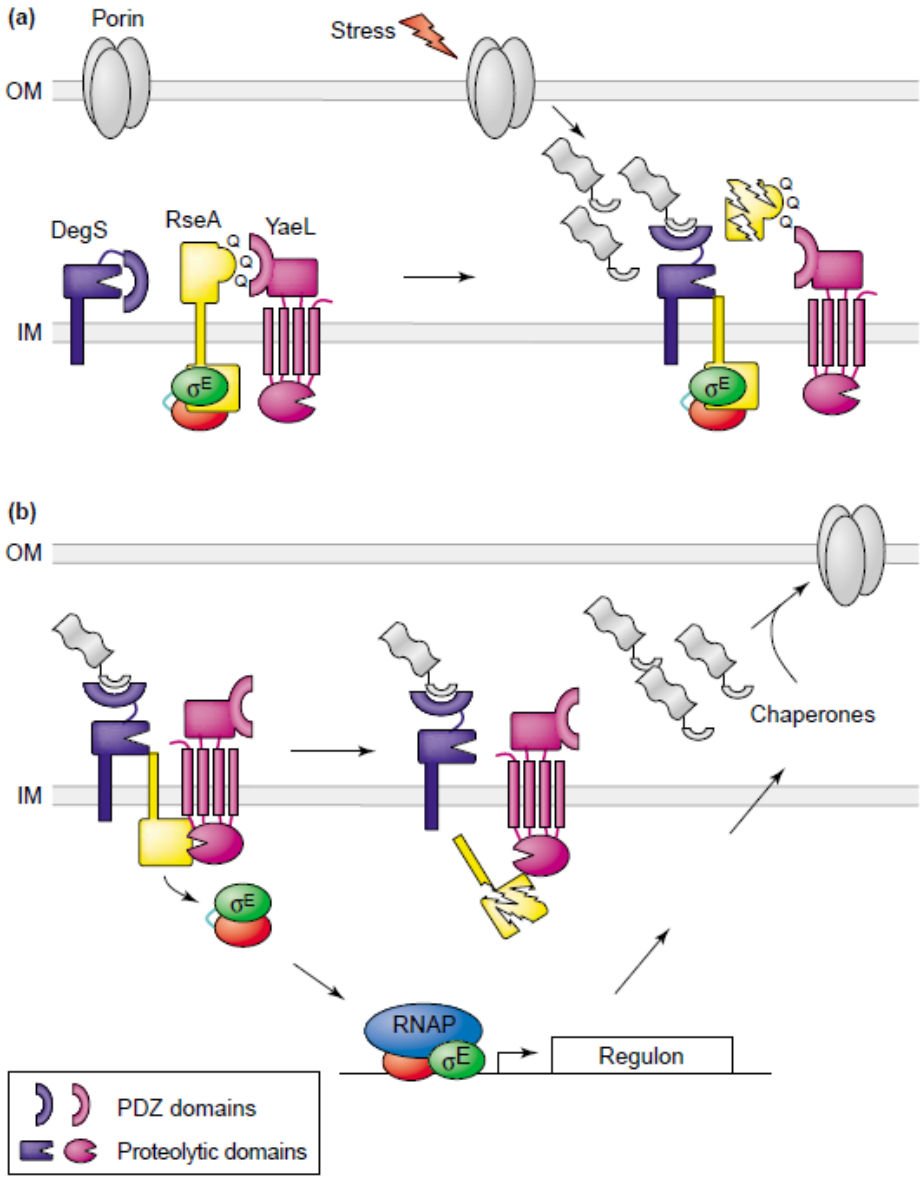


Figura 10: Mecanismo de transdução de sinal para ativação do fator σ^E em resposta a estresses que levam ao desenovelamento de porinas de membrana externa. (A) Início da degradação de RseA por DegS. Na ausência de estresse na célula, DegS e Yael estão na conformação inativa e os domínios PDZ estão inibidos para as interações. O domínio PDZ de Yael interage com uma região rica em glutamina (representado de forma simplificada na figura com a letra Q) no domínio periplasmático de RseA. Na presença do estresse celular, a região C-terminal das porinas desenoveladas interagem com o domínio PDZ de DegS, ativando DegS para clivar o domínio periplasmático de RseA. (B) Após a remoção do domínio periplasmático de RseA, Yael degrada os fragmentos remanescente de RseA, deixando o fator σ^E livre para associar-se ao núcleo da RNA polimerase e ativar a transcrição dos genes no regulon. OM: membrana externa e IM: membrana interna (Ades, 2004).

1.6 Biossíntese de flagelo

O flagelo bacteriano é uma estrutura altamente complexa e é responsável pela motilidade, processo pelo qual a bactéria pode se deslocar de um ambiente estressante para um ambiente favorável (Amsler *et al*., 1993). Embora a quantidade de energia exigida para a formação e a movimentação do flagelo seja alta, as bactérias flagelares apresentam uma grande vantagem adaptativa. O flagelo é formado por três estruturas protéicas: corpo basal, gancho e o filamento (Figura 11). O filamento é composto por repetições da proteína flagelina (Abram *et al*., 1970) e a biossíntese de flagelo foi bem estudada em *Escherichia coli* e *Salmonella entérica* (Pallen *et al*., 2005).

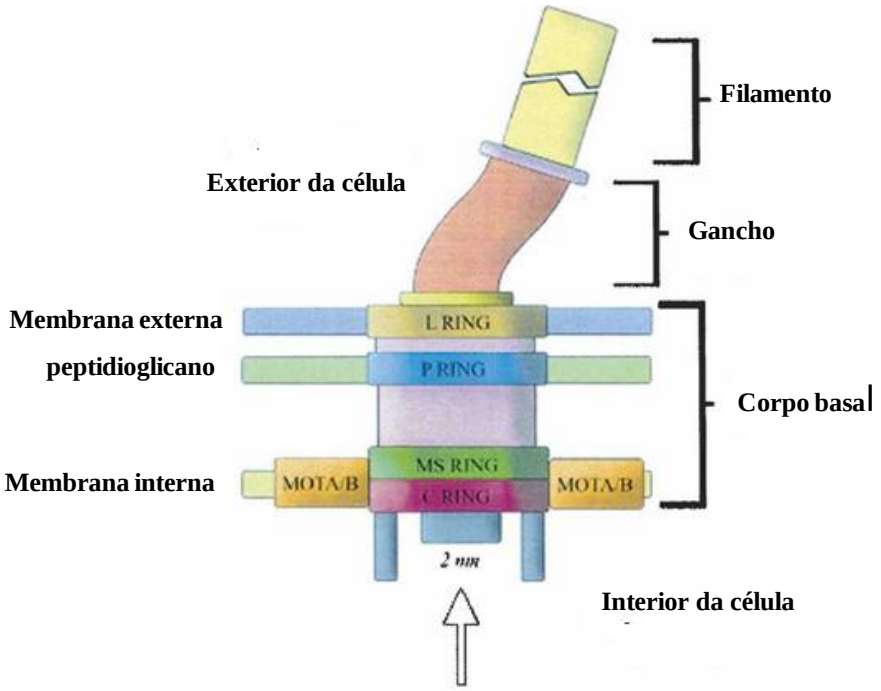


Figura 11: Esquema simplificado de representação do flagelo (Waters *et al*., 2007)

A expressão dos genes flagelares é regulada de forma hierárquica por diferentes reguladores (Appel & Surette, 2007; BrutineL & Yahr, 2008; Chevance & Hughes, 2008; McCarter, 2006) (Figura 12). Em enterobactérias, os genes flagelares são divididos em três

classes: classe I, corresponde aos genes *flhDC* dependentes do fator σ^{70} e controlam a expressão dos genes da classe II; classe II, inclui o fator σ^{FliA} e as proteínas da estrutura do flagelo; classe III, que dependem do fator σ^{FliA} ativo e são responsáveis pela transcrição das proteínas flagelinas. Vários mecanismos espécie-dependentes de controle da expressão dos genes e a formação do flagelo tem sido descritos na literatura. O fator anti-σ FlgM inibi a atividade do fator σ^{FliA}. Quando o complexo corpo basal-gancho está completo, o FlgM é expelido do citoplasma através da maquinaria secretória do flagelo (Kutsukake & Lino, 1994). A duração da expressão dos genes da classe III é limitada devido ao aumento da taxa proteolítica do σ^{FliA} na ausência de FlgM (Barembruch & Hengge, 2007).

Um segundo tipo de regulação de formação do flagelo ocorre nas bactérias do gênero *Vibrio* e *Pseudomonas*, que possuem um único flagelo polar. Nesses gêneros, os fatores σ^{54} e σ^{FliA} estão envolvidos na regulação da expressão dos genes flagelares. O fator σ^{54}, juntamente com dois ativadores da família NtrC, regulam a expressão dos genes das classes II e III, enquanto que o fator σ^{FliA} regula a expressão dos genes da classe IV, que codificam proteínas flagelares e algumas proteínas relacionadas com a quimiotaxia, em conjunto com a regulação negativa do FlgM (Figura 12) (Dasgupta *et al*., 2003).

Yang e colaboradores (2009) demonstraram que a expressão das três classes de genes flagelares em *Xanthomonas campestris* pv. campestris *(Xcc)* são dependentes dos fatores σ^{70}, σ^{54} e σ^{FliA}. FleQ, um ativador do σ^{54}, é requerido para ativar a transcrição dos genes flagelares. Um dos dois genes *rpoN* que codificam σ^{54} (*rpoN2*) é essencial para a flagelação. O fator σ^{54}, juntamente com FleQ direcionam a expressão do fator σ^{FliA}. A expressão de *fliC* que codifica flagelina depende do fator σ^{FliA}, enquanto que o fator anti-σ FlgM controla a atividade do fator σ^{FliA} e inibe a transcrição do regulon FliA (Figura 12). As cepas mutantes dos fatores σ^{54} (RpoN2) e do σ^{FliA} não possuem flagelo e a cepa mutante do fator anti-σ FlgM apresenta uma estrutura flagelar menor e anormal. Dessa forma, em *Xcc*, o fator σ^{54} e σ^{FliA}

são essenciais para a biossíntese do flagelo e o fator anti-σ FlgM é essencial para a formação das suas estruturas normais.

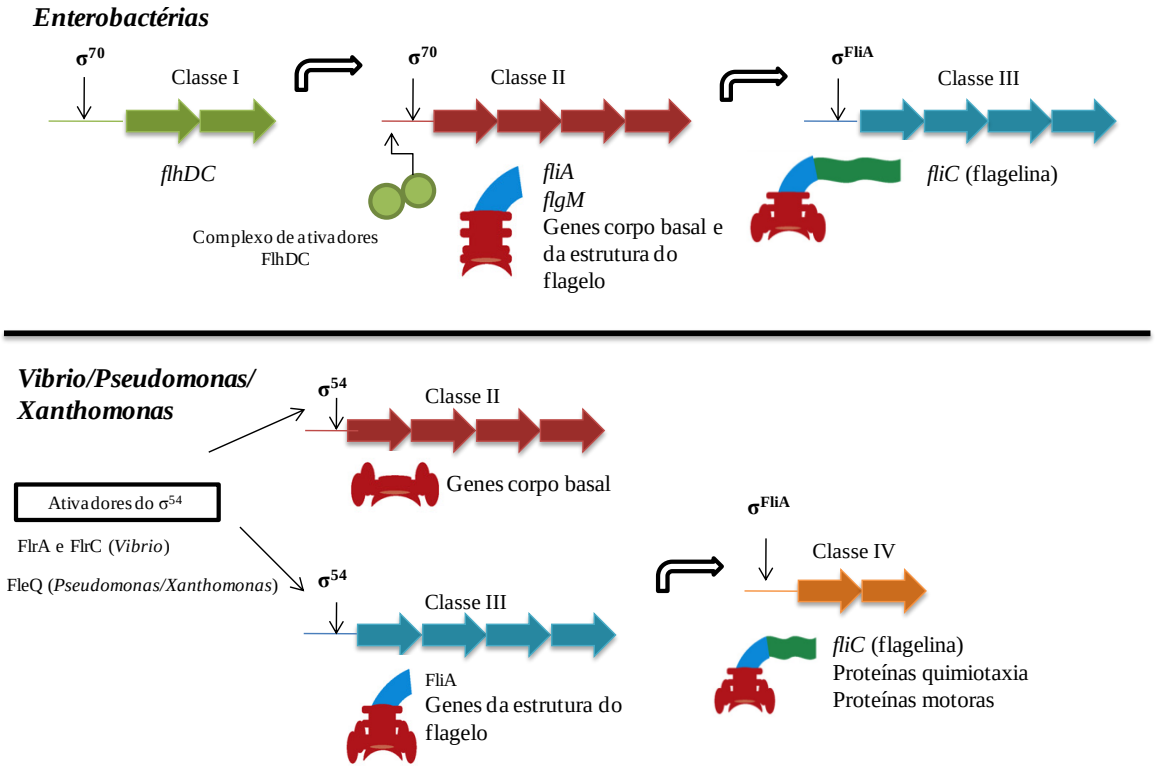


Figura 12: Representação esquemática do modelo de regulação dos genes flagelares. Em *enterobactérias*, o fator σ^{70} transcreve os genes da classe I (*flhDC*), que correspondem aos ativadores transcricionais responsáveis pela a transcrição dos genes da classe II, incluindo a transcrição do fator σ^{FliA} e os genes responsáveis pelo corpo basal e da estrutura do flagelo. Assim, o fator σ^{FliA} transcreve os genes da classe III, responsáveis pela transcrição de flagelina. Em *Vibrio*, *Pseudomanas* e em *Xanthomonas*, a transcrição dos genes flagelares das classes II e III depende do fator σ^{54} e dos ativadores do fator σ^{54} (FlrA e FlrC em *Vibrio*; FleQ em *Pseudomonas* e *Xanthomonas*). Já o fator σ^{FliA} transcreve os genes da classe IV, que codificam flagelina e algumas proteínas relacionadas a quimiotaxia (Anderson *et al*., 2009; Dasgupta *et al*., 2003; Yang *et al*., 2009).

1.7 Sistema de secreção tipo III (TTSS)

A interação da bactéria com a célula hospedeira é mediada por efetores localizados na superfície da célula bacteriana, que são secretados para o meio extracelular ou que são injetadas para dentro da célula eucariótica. O mecanismo mais comum adotado pelas bactérias Gram–negativas para transferir efetores para a célula hospedeira é o sistema de secreção do

tipo III (TTSS) (He *et al.*, 2004). O TTSS foi identificado em vários patógenos humanos, como *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica e enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella* spp. e *Chlamydia* spp. e também em fitopatógenos, como *Ralstonia solancearium*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* spp. e *Xanthomonas* spp. (Hueck, 1998). A variedade de efetores secretados na célula do hospedeiro varia consideravelmente entre as bactérias, sendo relacionado ao estilo de vida exigido a um determinado hospedeiro em particular. No entanto, muitos componentes do aparato do TTSS usados para o transporte de efetores são altamente conservados na sequência e na função entre as bactérias (Ghosh, 2004).

A estrutura do sistema de secreção do tipo III é composta por aproximadamente 20 proteínas diferentes, sendo que metade dessas proteínas são conservadas na maioria dos TTSS. Entre as proteínas conservadas, grande parte possui alta similaridade em sequência em relação às proteínas que constituem o corpo basal do flagelo bacteriano, provavelmente devido a uma história evolutiva comum entre os sistemas (Figura 13) (Blocker *et al.*, 2003; Tampakaki *et al.*, 2004). Com base em evidências filogenéticas, foi levantada a hipótese de que o TTSS tenha surgido no início da evolução, através das duplicações de forma independente de alguns genes flagelares (Nguyen *et al*., 2000; Saier, 2004). No entanto, outra análise sustenta a hipótese de que o TTSS é tão antigo quanto o sistema flagelar e que, portanto, são derivados de um ancestral comum (Gophna *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2005).

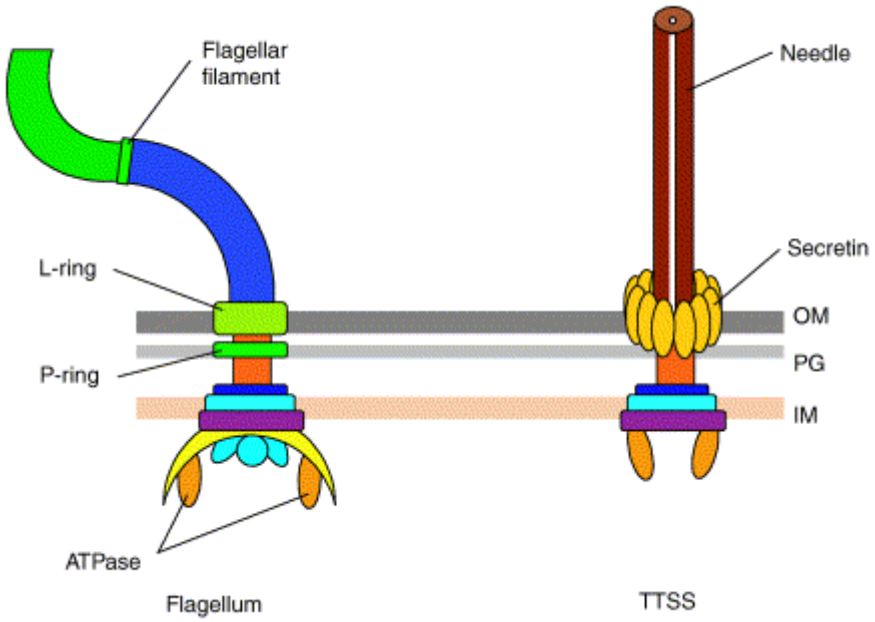


Figura 13: Comparações das estruturas dos flagelos (à esquerda) e do Sistema de Secreção do tipo III (à direita). Estruturas homólogas na região basal estão representadas com as mesmas cores e as estruturas não homólogas com corês diferentes. No flagelo, o anel-L interage com a membrana externa, o anel-P ancora as estruturas na camada de peptideoglicano e a hidrólise de ATP através de ATPase fornece energia para a montagem do sistema e para a exportação (Saier, 2004). (IM) membrana interna, (PG) camada de peptideoglicano e (OM) membrana externa.

Em fitopatógenos, o sistema secreção tipo III é codificado por um grupo de aproximadamente 20 genes *hrp*, organizados em um lócus que contém vários operons no cromossomo ou no plasmídeo do fitopatógeno (Arnold *et al*., 2003). Os genes *hrp* (“*hypersensitive response and pathogenicity”)* são determinantes para a patogenicidade, pois, são essenciais para a bactéria se mutiplicar em plantas susceptíveis e desencadear a doença. Estes genes também são responsáveis pela indução da resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas não hospedeiras (Büttner & Bonas, 2002). Muitas vezes, o grupo dos genes *hrp* está flanqueado por genes que codificam proteínas efetoras do TTSS ou por genes relacionados à virulência (Alfano *et al*., 2000; Arnold *et al*., 2003). A expressão dos genes TTSS é controlada por vários fatores ambientais e também por fatores do hospedeiro (Arlet *et al*., 1992; Rahme *et al*., 1992; Schulte & Bonas, 1992; Wei *et al*., 1992; Xiao *et al*., 1992).

Os padrões de expressões dos genes *hrp* são semelhantes em *Erwinia, Pseudomonas, Pantoea*, *Ralstonia* e *Xanthomonas.* Os genes *hrp* são reprimidos quando as bactérias são cultivadas em meio líquido rico, mas são expressos em elevados níveis quando a bactéria cresce no apoplasma da planta ou em contato com a célula da planta (Arlat *et al*., 1992; Huynh *et al*., 1989; Wei *et al*., 1992; Xiao *et al.*, 1992). A indução dos genes *hrp* ocorre logo após o contato com a planta e a expressão varia de 5 a 70 vezes (Rahme *et al*., 1992; Brito *et al*., 2002; Tang *et al*., 2006).

As substâncias presentes no tecido vegetal capazes de induzir a expressão dos genes *hrp* ainda são desconhecidas. No entanto, os genes *hrp* são expressos quando a bactéria é cultivada em meio mínimo (Arlat *et al*., 1992; Huynh *et al*., 1989; Wei *et al*., 1992; Xiao *et al.*, 1992). Os fatores que afetam a expressão dos genes *hrp* em meio mínimo são diferentes entre as espécies e patovares, portanto, a composição do meio de indução é um pouco variável em cada organismo. A elevada osmolaridade, fonte de nitrogênio, como peptona e casaminoácidos, reprimem a expressão dos genes *hrp*. A natureza da fonte de carbono também desempenha um papel importante, já que os substratos possuem atividades particulares para cada espécie. Por exemplo, o piruvato é ideal para induzir a expressão dos genes *hrp* em *R. solancearun*, no entanto, em *P.syringae* pv. glycinea e em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria não há indução. Já o manitol é ideal para *Erwinia amylovora,* enquanto que a sacarose, o açúcar mais abundante no tecido folicular, é ideal para a indução dos genes *hrp* na maioria dos organismos, como por exemplo, *P.syringae* (Huynh *et al*., 1989). Em *E. amylovora* e *P.syringae*, as expressões dos genes *hrp* também são afetadas pelo pH, uma vez que os genes *hrp* são transcritos em pH próximo a 5,5, com exceção de *Xanthomonas campestris pv.vesicatoria,* onde a melhor indução ocorre em pH 6,5 a 7,5 (Wei *et al*., 1992; Huynh *et al*., 1989; Schultle & Bonas, 1992).

A transcrição dos genes TTSS em fitopatógenos é controlada por uma rede de reguladores que integram diversos estímulos ambientais. Esses reguladores, no entanto, diferem significativamente entre as espécies (Figura 14). De acordo com a estrutura do operon *hrp* e o mecanismo de controle da expressão desses genes *hrp*, os reguladores foram divididos em dois grupos. O grupo I é formado pelos genes *hrp* de *Erwinia spp*., *Pantoea stewartii* e *Pseudomonas syringae* e são regulados por um fator σ HrpL (Figura 14A e 14B). Os fatores σ HrpL são altamente conservados entre essas espécies e reconhecem uma região consenso (GGAACC-N15/16-CCACNNA) chamada de "Box hrp", presente nas regiões promotoras dos operons de *hrp* e de genes que codificam proteínas efetoras (Fouts *et al*., 2002; Frederick *et al*., 2001; Wei & Beer, 1995). O HrpL é parcialmente regulado por HrpS, membro da família das proteínas ativadoras do fator σ^{54} e do sistema de dois-componentes HrpX-HrpY em *Erwinia* spp. e *Pantoea stewartii* (Figura 14B). A expressão do grupo de genes *hrp* é modulada por condições ambientais, como fonte de carbono, temperatura e pH (Wei *et al*., 1992; Gaudriault *et al*., 1997; Gürlebeck *et al*., 2006). Em *Pseudomonas syringae*, a expressão do gene *hrpL* é mediada por HrpR e HrpS (Figura 14A), duas proteínas que se ligam ao DNA como heterodímero na região promotora de *hrpL* (Hutcheson *et al*., 2001; Xiao *et al*., 1994). O heterodímero HrpR-HrpS ativa a transcrição de *hrpL* por interação com o fator σ^{54} (Chatterjee *et al*. 2003; Hendrickson *et al*. 2000).

No grupo II dos TTSSs, parte do locus *hrp* é ativado por um regulador transcricional da família AraC, denominado de HrpB em *Ralstonia solanacearum* (Genin *et al*., 1992) e HrpX em *Xanthomonas spp.* (Kamdar *et al*., 1993; Wengelnik & Bonas 1996). As proteínas HrpB e HrpX possuem grande similaridade de sequência. As regiões promotoras do locus *hrp* e dos genes que codificam proteínas efetoras reguladas por HrpB e por HrpX possuem um região consenso chamada de "PIP-box" (Plant-inducible promoter TTCGC-N15-TTCGC) em

Xanthomonas spp. (Buttner & Bonas, 2002) e “hrpII-box” (TTCG-N16-TTCG) em *R. solanacearum* (Cunnac *et al*., 2004).

A transcrição de *hrpX* ou de *hrpB* é ativada em meio mínimo e é regulada pelo o produto de *hrpG* (Brito *et al*., 1999; Wengenilk *et al*., 1996). O gene *hrpG* codifica uma proteína da subfamília OmpR dos reguladores de resposta de sistema dois-componentes, possui na região N-terminal um domínio regulador de resposta e na região C-terminal um domínio de ligação ao DNA. Uma análise do regulon *hrpG* no genoma de *Xcc* revelou que HrpG controla a expressão dos genes que codificam reguladores transcricionais, adesinas e efetores do tipo III (Watt *et al*., 2009). Em *Xanthomonas campestris pv.vesicatoria* a expressão do gene *hrpG* é baixa em meio rico e em meio mínimo há um aumento da expressão de 4 vezes (Wengelnik & Bonas, 1996).

A via de transdução de sinal que ativa os genes *hrp* foi muito bem estudada e caracterizada em *R. solanceraum* (Aldon *et al*., 2000) (Figura 14C). A bactéria em contato com a planta recebe um sinal de indução que é percebido por uma proteína de membrana externa homóloga aos receptores de sideróforos TonB dependente (PrhA) (Marenda et al., 1998) e transmite o sinal para PrhR, uma proteína de membrana interna e para o fator σ PrhI. O fator σ PrhI ativa a transcrição do gene *prhJ* cujo produto codifica um regulador transcricional que por sua vez ativa a transcrição de *hrpG* (Brito *et al.*, 1999; Brito *et al*., 2002). O regulador HrpG é considerado o principal ativador dos genes *hrp*, pois ativa a transcrição de *hrpB* (Figura 14C). Apesar dos TTSS de *Ralstonia* spp e *Xanthomonas* spp terem sido classificados no mesmo grupo, uma via de transdução de sinal que regula a expressão de *hrpG* em *Xanthomonas* ainda não foi descrita.

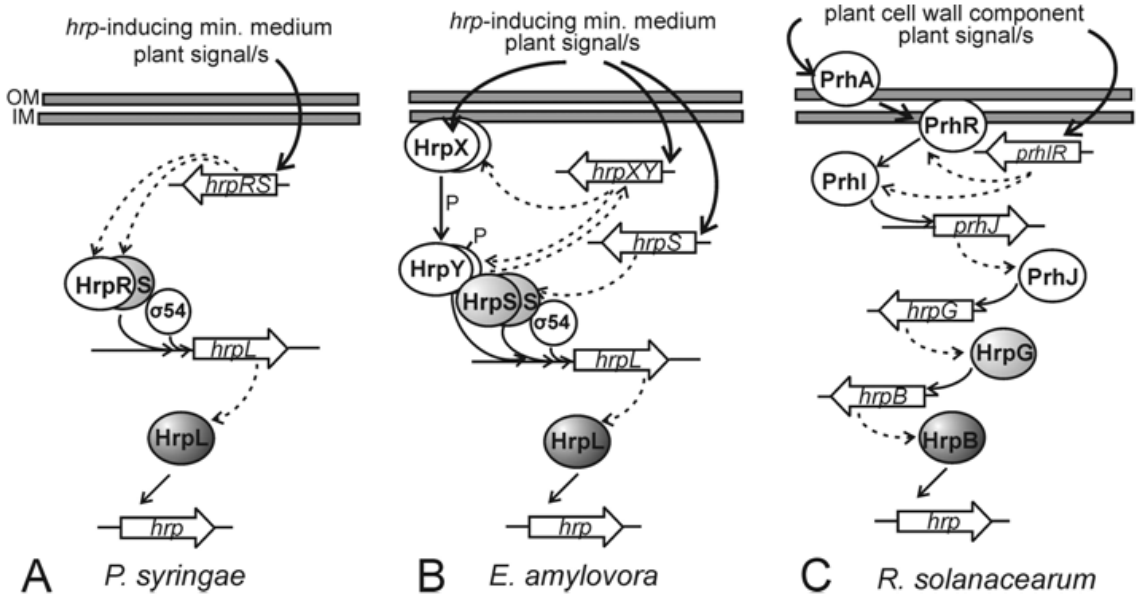


Figura 14: Modelo de regulação da cascata de ativação dos genes *hrp*. (A) Em *P.syringae* a expressão dos genes *hrp* depende do fator σ HrpL que por sua vez depende dos produtos do operon *hrpRS*. (B) Em *E.amylovora* a expressão dos genes *hrp* também depende do fator HrpL, no entanto, a expressão de *hrpL* é mediada por HrpS e por um sistema de dois-compomentes HrpX-HrpY. (C) Em *R.solanaceraum* a proteína PrhA está envolvida na detecção do sinal da planta e é transmitido ao PrhR que ativa o fator σ^{ECF}, PrhI. PrhI induz a transcrição do gene que codifica um regulador transcricional PrhJ, levando a expressão de *hrpG*. HrpG ativa a expressão de hrpB, o que resulta na ativação dos genes *hrp*. (OM) membrana externa e (IM) membrana interna (Brencic & Winans, 2005)

1.8 Fatores sigma de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

Xanthomonas axonopodis pv. citri possui um cromossomo circular de 5,1 Mb e dois plasmídeos, pXAC64, de 64Kb, e PXAC33, de 33Kb. Após sequenciamento do genoma desse organismo, um total de 4.313 possíveis regiões codificantes (ORFs, "open reading frame") foram identificadas na época do seqüenciamento do genoma aproximadamente 2.710 ORFs possuem homologia com proteínas existentes no banco de dados. Dessas proteínas, 1.272 apresentam homologia com proteínas de função desconhecida (proteínas conservadas hipotéticas) e 331 não apresentam nenhuma homologia com as proteínas existentes nos bancos de dados públicos (proteínas hipotéticas).

Muitas proteínas anotadas em *Xac* estão relacionadas a patogenicidade, virulência e adaptação, como por exemplo, as proteínas relacionadas ao TTSS, proteínas associadas à degradação da parede celular do hospedeiro, enzimas associadas na síntese de exopolissacarídeos, biossíntese de flagelo, proteínas envolvidas em mecanismos de adaptação a condições estressantes, como proteínas de choque térmico e vias de transdução de sinal. Os fatores sigma são importantes na ativação da transcrição de genes específicos a determinados sinais ou condições.

No genoma de Xac foram identificados 14 fatores sigma, entre eles o fator $\sigma^{70}_{Xac3788}$, os fatores $\sigma^{54}_{Xac1969}$ e $\sigma^{54}_{Xac2972}$, o fator $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$, o fator $\sigma^{32}_{Xac3824}$ e nove fatores σ^{ECF}. Também foram identificados potenciais reguladores dos fatores σ, como por exemplo fatores anti-σ, fatores anti-anti-σ e fatores ativadores do fator σ^{54}.

Segue uma breve descrição de cada classe de proteínas encontradas em *Xac*, que serão os nossos principais objetos de estudo nesta tese:

I) $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$, codificado pelo gene *fliA*. Em enterobactérias FliA é responsável pela expressão dos genes flagelares tardios. O genoma de Xac também codifica um homólogo do fator anti-σ FlgM, anti-$\sigma_{Xac1989}$, responsável pela inibição do fator σ^{FliA} (Helmann, 1999). A designação de Xac1933 como verdadeiro fator σ^{FliA} é apoiado por sua localização dentro de um grande lócus que codifica em torno de 26 proteínas associadas com o sistema flagelar. Esta localização gênica é similar ao encontrado para fatores σ^{FliA} de *Pseudomonas*, *Vibrio*, *E.coli* e *Salmonella*.

II) $\sigma^{32}_{Xac3824}$, codificado pelo gene *rpoH* (*Xac 3824*) pertence ao grupo de fatores sigma de choque térmico que inclui σ^{H} de *E.coli*.

III) 9 fatores σ^{ECF}: $\sigma^{ECF}_{Xac2814}$, $\sigma^{ECF}_{Xac3989}$, $\sigma^{ECF}_{Xac0922}$, $\sigma^{ECF}_{Xac1319}$, $\sigma^{ECF}_{Xac1380}$, $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$, $\sigma^{ECF}_{Xac4128}$, $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$. Os papéis desta classe de fatores sigma em *Xac* ainda não foram caracterizados. Em outros organismos, estes fatores sigma estão envolvidos em

respostas a mudanças ambientais e controlam a síntese de alginato, captação de ferro, síntese de carotenóides, produção de antibióticos, indução de fatores de virulência e resistência a diferentes estresses como choque térmico, estresse oxidativo e presença de etanol (Wosten, 1998).

IV) um anti-anti-$\sigma_{Xac0570}$, homólogo ao o fator anti-anti-σ spoIIAA de *B. subtillis*. O spoIIAA está envolvido na regulação da esporulação (Perego, 1998). A presença de um homólogo de spoIIAA em *Xac* é um enigma no momento, pois, *Xac* aparentemente não tem homólogos de σ^F ou o outro componente da sua via regulatória, o fator anti-σ^F spoIIAB.

V) *rsbR (Xac1269), rsbS (Xac1270), rsbT (Xac1271)* que são reguladores positivos e negativos do σ^B em *B. substillis.* Eles estão envolvidos na transmissão de sinais ambientais para *rsbU*, *V* e *W* que são fatores anti-σ^B e anti-anti-σ^B (Hellman, 1999). Novamente, o papel deste cluster de genes em *Xac* não é claro, pois esta bactéria não possui homólogos de σ^B e nem dos outros componentes da rede de controle de σ^B (*rsb U, V, W e X*).

VI) Por último, o genoma de *Xac* codifica dois membros da família σ^{54}. Em outras bactérias, estão envolvidos na fixação de nitrogênio, utilização de nitrato, síntese de fimbria e expressão de genes envolvidos na patogenicidade (Studholme & BucK, 2000). Os genes foram anotados como Xac 969 e Xac2972. Enquanto a maioria das bactérias possuem uma cópia de *rpoN*, poucas possuem conhecidamente dois σ^{54} e, nesses casos, as funções específicas de cada homólogo não foram bem definidas (Studholme & BucK, 2000).

Como os mecanismos que associam essas proteínas as suas funções em *Xac* são, na maior parte, desconhecidos, o estudo envolvendo proteínas pertencentes aos grupos citados acima pode ajudar na melhor compreensão do papel desses fatores σ nesse organismo e principalmente, na melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade desse fitopatógeno.

2. Objetivos

Nosso objetivo foi o estudo de interações e funções dos fatores sigma de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.

Os nocautes gênicos para alguns fatores sigma foram produzidos e utilizados na investigação de seus papéis no processo de motilidade e resposta a diferentes estresses ambientais, como choque térmico, carência de ferro e agentes oxidantes. Também foi analisado a possibilidade do envolvimento dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ na cascata de ativação dos genes *hrp em Xac*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Clonagem dos genes *Xac3788, Xac1969, Xac2972, Xac3824, Xac2814, Xac0922 Xac1682, Xac1319, Xac1380, Xac3989, Xac4128, Xac2191, Xac2192, Xac4129, Xac4130, Xac1269, Xac1270, Xac1271 e Xac0571* no vetor pOBD

3.1.1 Amplificações dos genes usados como isca no sistema duplo-híbrido de levedura

As amplificações dos genes que codificam os 14 fatores sigma, alguns fatores anti-sigma e proteínas reguladoras utilizados como isca no sistema duplo-híbrido de levedura foram feitas seguindo o protocolo de amplificação da "Platinum *Taq* DNA polimerase High Fidelity" (Invitrogen,). Os oligonucleotídeos usados e suas respectivas temperaturas de anelamento são descritas na Tabela 1. Os produtos de PCR foram analisados em um gel de agarose 1% e a purificação dos mesmos foi feita utilizando-se o kit "Concert Nucleic Acid Purification System" (GibcoBRL).

Os genes amplificados e o vetor foram digeridos com os pares de enzimas de restrição específicos para cada caso (Tabela 1 e Figura 15). Após as digestões, o vetor e os fragmentos foram precipitados com etanol/acetato de sódio e ressuspendidos em tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA). O DNA obtido foi analisado em um gel de agarose 1% onde foram verificadas a sua concentração e as quantidades a serem usadas nas reações de ligação. As reações de ligação no vetor pOBD (Uetz et al., 2000) foram feitas utilizando a proporção 1:3 (vetor: inserto) e 1U da enzima T4 DNA ligase (Biolabs) em 10 µl finais. As reações foram incubadas a 16°C por 12 h.

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos utilizados nas clonagens no vetor pOBD.

Oligonucleotídeo	Sequência
3788F(NcoI)	5’ GCGAGCACCCATGGCCAACGAACGTC3´
3788R(XhoI)	5´GGTCGCGACTCGAGACTTAGTCGATATCCAGGAAC 3´
1969F(NcoI)	5´CGGAAGCGCTTCCATGGAGACGACCA 3´
1969R(XhoI)	5´TTTGCTCATCTCGAGCCTTATCCTGCCCGGGCAACC 3´
2972F(NcoI)	5’ATCCATGGAAGCCCGGCTCCAGACATCG 3’
2972R(XhoI)	5’AGCTCGAGATTTAGGCGATGCGCACGCG 3’
3824F(NcoI)	5´CTAAGATGGTGCCCATGGACCAGACTACCTC 3´
3824R(XhoI)	5´GCGCAAGACCTCGAGGATTAGGCGACGAACA 3´
2814F(NcoI)	5´GACCGGAGCCATGGCCCTGGACAC 3´
2814R(NcoI)	5´CGGTGGCCTCGACGCTTACAGCTGCGCCG 3´
0922F(PvuII)	5´ TGGCTCCACCAGCTGATGCGGCCCGCCG3’
0922R(XhoI)	5´GGTGTCGTGCTCGAGGTTTACAGGAAATCCTCGAAC3´
1682F(NcoI)	5´CATGCCTGCACCCATGGATGATACCGACACC 3´
1682R(XhoI)	5´CGCGATGAACTCGAGCTTTATTGCATGGTCT3´
1319F(NcoI)	5´CGGCCCGCCATGGCCGAAGTCGAC3’
1319R(XhoI)	5´CATGGCAGACTCGAGGTTTATACGCGGTGTCGCTCAC 3’
1380F(NcoI)	5´AACGCCCGACCCCATGGGTGCCATTCC 3´
1380R(XhoI)	5´GATGGGAAACTCGAGACTAATCGTTCCAGACATGCCTTGAG 3´
3989F(NcoI)	5´ACGCCCGCCCATGGATGCTTTGGACG 3´
3989R(XhoI)	5´GTCGGGCGGCTCGAGGGTTATTTCAGGATCCTCAA 3’
4128F(NcoI)	5´GATGGGCTTCCATGGCCGAGCTGCCGAT3´
4128R(XhoI)	5´CGGTGGCCTCGACGCTTACAGCTGCGCCG 3
2191F(EcoRI/NdeI)	5’ ATGAATTCCATATGTCCAGCGCCGTCGACGAATGG 3’
2191R(NcoI/BamHI)	5’ TACCATGGTAGGATCCTTAATCTGCCTGCTGTCC 3’
2192F(EcoRI/NdeI)	5’CGGAATTCCATATGGACAGCAGGCAGATTGAGC 3’
2192R(BamHI/Sal)	5’GGATCCTGTCGACTATTAGCGGGCGTGGAGGAT3’
4129F(NcoI)	5´GGAGGTTGCCATGGCGGCACATCCAAAGCG 3´
4129R(XhoI)	5´CGCCAGCGACTCGAGGCTTACCACCACTG 3´
4130F(EcoRI)	5’GAGGGAGCGCAGAATTCGTGAGCGT3’
4130R(XhoI)	5’ TTGGCCTCGAGCCTTACCGGTT3’
1269F(NcoI)	5´CCCAACCTCTTTTCCCATGGTGGGTGATCTCA 3´
1269R(XhoI)	5 TCGGAATACCTCGAGTGTTAGTCCGCCCTGCTGACG3
1270F(NcoI)	5 TCGGAATACCTCGAGTGTTAGTCCGCCCTGCTGACG3
1270R(XhoI)	5´CGGTTGCGACTCGAGCGTTATGGAGCCGCAT 3´
1271F(NcoI)	5´AACGCCCGACCCCATGGGTGCCATTCC 3´
1271R(XhoI)	5´GATGGGAAACTCGAGACTAATCGTTCCAGACATGCCTTGAG 3´
0570F(NcoI)	5´AGGCCCTGCCATGGCCACGCTCGC 3´
0570R(XhoI)	5´CGGTAGGACCTCGAGGCTTAGGCTTCGGCGAAG 3´

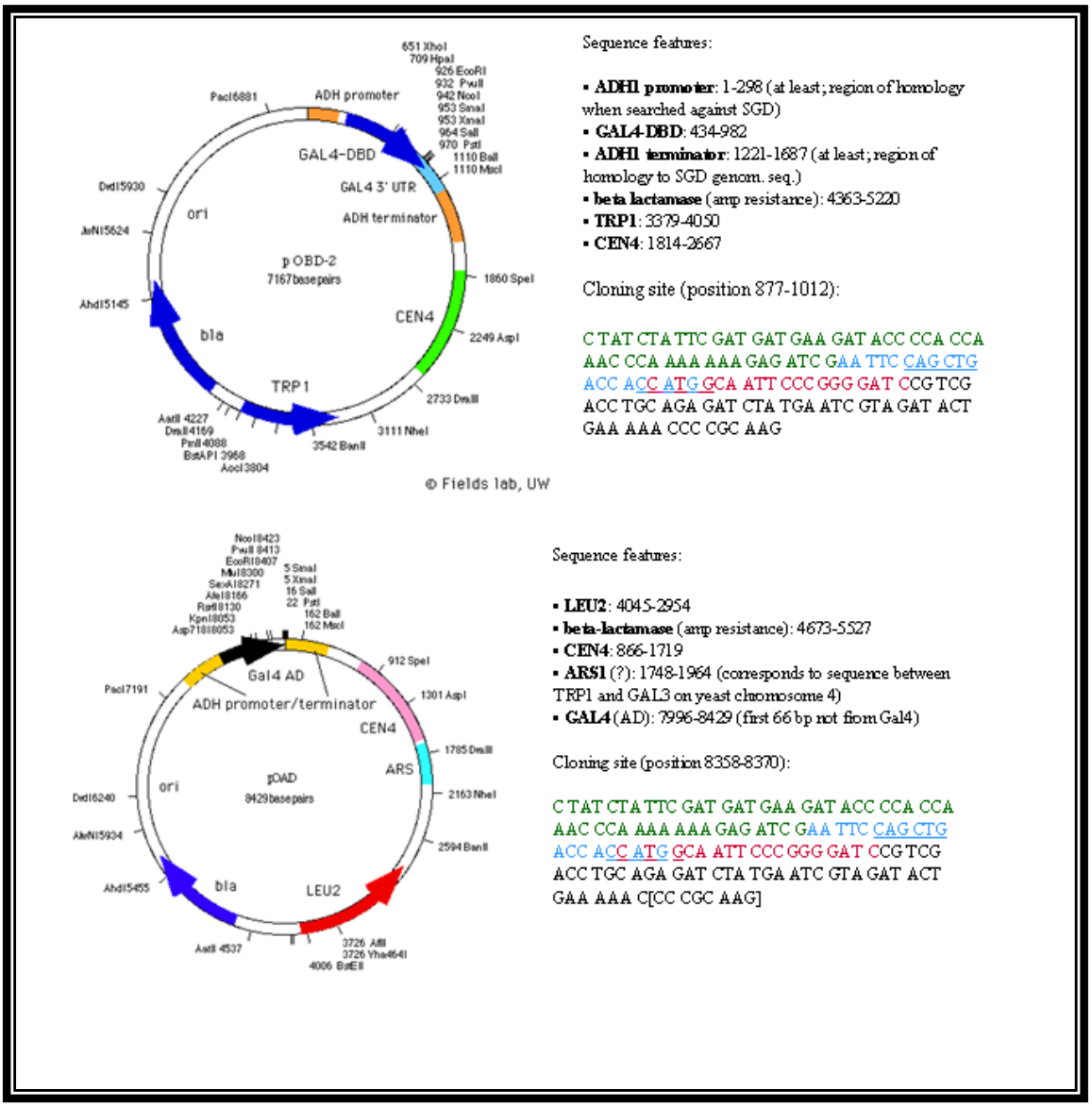


Figura 15: Mapa gênico do vetor pOBD e pOAD (Uetz *et al*., 2000). As figuras mostram as marcas de seleção (bla-resistência à ampicilina) e a de seleção auxotrófica (TRP1-pOBD e LEU2-pOAD); a origem de replicação em bactéria (*ori*) e de levedura (CEN4/ARS) e a sequência da região de clonagem (sítio múltiplo de clonagem).

3.2 Transformações de células competentes *E.coli DH10B*

Cinco mililitros de pré-inóculo de uma cultura saturada da linhagem *E.coli DH10B* foram transferidos para 500 mL de meio 2xTY (1,6% triptona, 1% extrato de levedura e 0,5% de NaCl) e posteriormente incubado sob agitação a 37°C. Após atingir uma DO_{600nm} de 0,6, a cultura foi centrifugada e ressuspendida em 250 mL de uma solução de 10% glicerol esterilizada. Após centrifugação, o precipitado de células foi novamente lavado com a solução

de glicerol e então ressuspendido em 1 mL de solução GYT (10% glicerol; 0,125% extrato de levedo e 0,25% triptona). As células foram aliquotadas e estocadas a –80°C.

As transformações das células bacterianas foram realizadas através da eletroporação em cubeta de 0,2 mm (GenePulser Cuvette). Um volume de 40 µl de células competentes foi eletroporado com 1 uL da reação de ligação (100Ω, 50 µF e 2,5 kV), e ressuspendido em 1mL de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedo; NaCl 10mM; $MgCl_2$ 10mM e glicose 20mM). A suspensão foi incubada por 60 min a 37°C sem agitação e em seguida, 100 µl da mesma foram plaqueados em meio 2xTY ágar (1,6% triptona; 1% extrato de levedo e 0,5% de NaCl) contendo carbenicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 12 h.

3.3 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

As extrações de DNA plasmidial em pequena escala foram feitas de acordo com Sambrook e colaboradores, 1989.

3.4 Reações de sequenciamento

As reações de PCR para seqüenciamento foram realizadas utilizando o kit “Big Dye Terminator Ready Reaction Mix” (Applied Biossystems) com algumas modificações referentes ao protocolo do fabricante. Para cada reação, utilizou-se 6 µL de tampão “save money” (200 mM de Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM de $MgCl_2$), 3,2 pmols de oligonucleotídeo, 200-500 ng de DNA, 1,5 µL de “Terminator Ready Reaction Mix” e água para um volume final de 20 µL. As condições da reação foram 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos para 40 ciclos. A precipitação e a aplicação no seqüenciador automático ABI 377 da Perkin Elmer seguiram o protocolo do equipamento. Foram utilizados oligonucletídeos que possibilitam as identificações dos clones no vetor pOBD. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados foram pOBD(MCS)F5´CAAAGACAGTTGACTGTATCGAACTATC3´/pOBD(MCS)R5´TTGAG

ATGGTGCACGATGCACAG3´). As seqüência obtida foi analisada através da comparação das seqüências com a do genoma de *Xac* por meio do programa BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.5 Identificação de interações proteína-proteína por ensaios de duplo-híbrido em leveduras

A linhagem PJ69-4a *Saccharomyces cerevisiae* (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) foi usada para os ensaios de duplo-híbrido (James *et al*, 1996). A metodologia de transformação foi feita segundo o protocolo descrito por Gietz e colaboradores (1998) obtido em www.research.bmn.com. A levedura foi estriada em meio SC (base de nitrogênio 0,66%, glicose 2%, mistura de aminoácidos 0,083%, ágar bacteriológico 1,6%, pH 5,6) ou YAPD (extrato de levedura 1%, peptona 25%, glicose 2%, adenina 0,008%, 1,5% ágar bacteriológico pH 5,6) e incubada por 16-24 horas a 30°C. Um volume de 25 µL de células foi coletado da placa e ressuspendido em 1mL de água ultrapura em um tubo de microcentrífuga, centrifugados por 30 segundos e ao precipitado foram adicionados os reagentes na seguinte ordem: 240µL PEG MW 3350 (50%), 36 µL acetato de lítio (1M), 50 µL ss-DNA de esperma de salmão (2mg/mL, Sigma), 2µL do plasmídeo pOBD (50 ng/uL) contendo o gene de interesse e água ultrapura para 360 µL finais. Após a ressuspensão, as células foram submetidas ao choque térmico a 42°C durante 30 minutos, centrifugadas e o precipitado de células foi ressuspendido em 400µL de água ultrapura e incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos. Uma alíquota de 200µL de células foram plaqueadas em meio Sc-W (Sc sem triptofano) e incubadas a 30°C durante 2-4 dias. As células transformadas com o vetor pOBD foram selecionadas em meio sem triptofano (Sc-W).

3.6. Teste de auto-ativação com os genes usados como isca no sistema duplo-híbrido

Para os testes de auto-ativação do repórter GAL1 HIS3, após transformação da levedura PJ69-4a com o clone de interesse, as células crescidas na ausência de triptofano, foram repicadas em meio Sc-W e incubadas por 16-24 h a 30°C. Após crescimento, uma alçada de células foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 1mL de água estéril e o material foi diluído na proporção 1:1000. A absorbância da diluição foi medida em OD_{600} (OD_{600nm} 0,1=1x10^6 UFC/mL) e um volume correspondente a 1000 colônias foi plaqueado em meio Sc-W (controle) e Sc-HW (Sc sem triptofano e histidina), em concentrações crescentes de 3-amino triazol (3-AT) iguais a 0mM, 3mM, 5mM, 10 mM, 25 mM e 50 mM 3-AT. As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e a concentração de 3-AT necessária para inibir o crescimento (auto-ativação) foi determinada para cada clone (Tabela 2).

Para os testes de auto-ativação do repórter GAL2 ADE, após transformação da levedura PJ69-4a com o plasmídeo pOBD contendo a isca, o clone com o gene de interesse foi isolado e estriado em meio SC-WA (Sc sem triptofano e adenina) e incubado a 30°C por 5 dias. A levedura que foi capaz de crescer nesse meio indicou a ativação do gene repórter (Tabela 2).

Tabela 2: Ensaio de auto-ativação para HIS3 e ADE2. As colunas SC-WH indicam as unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas em placas contendo concentrações crescentes de 3-AT. Na coluna SC-WA, (-) indica ausência de crescimento e (+) representa crescimento obtido após estriagem em placa.

Gene de interesse	Sc-W (UFC/placa)	Teste Sc–WH + 3amino triazol						Teste Sc-WA
		0mM	3mM	5mM	10mM	25mM	50mM	
Xac3788 σ^{70}	24	2	0	0	0	0	0	_
Xac1380 σ^{ECF}	251	0	0	0	0	0	0	_
Xac1682 σ^{ECF}	239	145	112	2	0	0	0	_
Xac1319 σ^{ECF}	200	100	15	3	2	0	0	_
Xac2972 σ^{54}	100	53	0	0	0	0	0	_
Xac1969 σ^{54}	55	0	0	0	0	0	0	_
Xac3824 σ^{32}	156	0	0	0	0	0	0	_
Xac2814 σ^{ECF}	312	0	0	0	0	0	0	_
Xac4128 σ^{ECF}	149	2	0	0	0	0	0	_
Xac3989 σ^{ECF}	240	102	0	0	0	0	0	_
Xac0922 σ^{ECF}	315	0	0	0	0	0	0	_
Xac4129 σ^{ECF}	273	0	0	0	0	0	0	_
Xac2191 σ^{ECF}	100	0	0	0	0	0	0	_
Xac4130 ant-σ	41	0	0	0	0	0	0	_
Xac1989 ant-σ (FlgM)	236	0	1	0	0	0	0	_
Xac1269 reg .posit .σ^{B}	31	0	0	0	0	0	0	_
Xac1270 reg. neg. σ^{B}	200	50	2	1	0	0	0	_
Xac1271 efetor neg. σ^{B}	130	0	0	0	0	0	0	_
Xac0570 anti-anti-σ	226	22	10	3	0	0	0	_

3.7 Transformação em larga-escala da linhagem PJ69-4a com a biblioteca de Xac

Uma biblioteca genômica de *Xac* contendo fragmentos entre 500 a 3000pb inseridas no vetor de presas pOAD (UETZ *et al*.,2000) foi produzida em nosso laboratório (Alegria *et al*, 2004; Alegria *et al*, 2005). Esta biblioteca consiste de aproximadamente 2 x 10^6 clones independentes. Considerando que o genoma de *Xac* codifica pouco menos que 5000 genes com um tamanho médio de aproximadamente 1Kb, o rastreamento das interações entre as proteínas de interesse requer um grande número de transformantes para que uma boa cobertura da biblioteca seja obtida. Dessa forma, as transformações dos vetores na cepa PJ69-

4a foram realizadas em larga escala, utilizando-se grande volume de células competentes e aproximadamente 30 µg de DNA de cada vetor, resultando em uma eficiência de 1,0 x 10^6 UFC

Nesse procedimento, a linhagem contendo o gene de interesse (presença do vetor pOBD) foi inoculada em 50 mL de meio Sc-W e incubada sob agitação a 30°C por 16 horas. Após este período, foi medida a OD_{600nm} e calculado o volume de pré-inóculo necessário para a obtenção de um total de 7,5x10^8 células, as quais foram centrifugadas, inoculadas em 150 mL de meio YAPD e incubadas a 30°C por aproximadamente 4h, sob agitação. Após a incubação, foi verificada a quantidade de células necessária para uma densidade óptica em OD_{600nm},= 2,0 o que corresponde a aproximadamente 2,0 x 10^7 UFC/mL. A cultura foi então dividida em 3 tubos de 50 mL e centrifugada a 4.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante e as células foram lavadas em 25 mL de água estéril, as células foram ressuspendidas em um único tubo com 3 mL de acetato de lítio (100mM). Em seguida, a solução foi incubada a 30°C por 15 minutos em banho-maria e centrifugada. Ao precipitado de célula foram adicionados os seguintes componentes: 7,2 mL de PEG (50%); 1,08 mL de LiAc (1,0M); 1,5mL de ss-DNA esperma de salmão (2mg/mL); 30 µL (30µg da biblioteca de presas de *Xac*) e 970 µL de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada em banho-maria a 30°C por 30 minutos, agitando-se bem o tubo a cada 10 minutos. Após este procedimento, a mistura foi submetida ao choque-térmico por 45 minutos a 42°C, invertendo-se o tubo a cada 5 minutos. A mistura foi então centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante ressuspendido em 10 mL de água ultrapura estéril. Um volume de 700 µL foi plaqueado em 14 placas (150x15mm) contendo meio Sc-WLH + 3mM 3-AT (para os clones negativos em auto-ativação GAL-HIS). Em outra placa contendo Sc-WL, foram plaqueados 100 µL de uma diluição 1:100 da mistura (controle do número de transformantes totais). As placas foram incubadas a 30°C durante 14 dias.

Os clones que cresceram em meio Sc-WLH + 3mM de 3-AT foram repicados em placas contendo meio Sc-WLHA+ 3mM de 3-AT e incubados a 30°C por 4 dias. Somente foram considerados positivos os clones capazes de ativar simultaneamente os genes repórteres GAL2-ADE2 e GAL1-HIS3, ou seja, capazes de crescer em meio Sc-WLH e Sc-WLHA (Tabela 3).

Tabela 3: Lista das proteínas utilizadas como iscas nas triagens de duplo-híbrido.

Iscas	N^{o}de transformantes	N^{o} de clones positivos (meio Sc-WLHA)	N^{o} de ensaios de duplo híbrido
Xac3788 σ^{70}	2,7 x 10^{5} UFC	64	1
Xac1380 σ^{ECF}	7,6 x 10^{5}/0,5 x 10^{5} UFC	60	2
Xac1682 σ^{ECf}	2,71x10^{6}UFC	96	2
Xac1319 σ^{ECF}	1,28x10^{6}/2,6 x 10^{6} UFC	96	2
Xac2972 σ^{54}	5,8 x 10^{5} UFC	96	1
Xac1969 σ^{54}	1,0 x 10^{6} UFC	96	2
Xac3824 σ^{32}	2,25 x 10^{6}/4,7 x 10^{5} UFC	33	2
Xac2814 σ^{ECF}	7,1 x 10^{5}/2,6 x 10^{5} UFC	74	2
Xac4128 σ^{ECF}	2.6 x 10^{6} /8,0 x 10^{5} UFC	33	2
Xac3989 σ^{ECF}	3,6 x 10^{6}/9,0 x 10^{5} UFC	14	2
Xac0922 σ^{ECF}	2,09 x 10^{6}/1,17 x 10^{6} UFC	27	2
Xac4129 σ^{ECF}	3,04 x 10^{6} /1,57 x 10^{6} UFC	28	2
Xac2191 σ^{ECF}	6,1 x 10^{5} UFC/ 1.28 x 10^{6} UFC	2/96	2
Xac2192 anti-σ	1,35 x 10^{6} UFC	96	1
Xac4130 ant-σ	1,7 x 10^{5} /6,7 x 10^{5} UFC	38	2
Xac1989ant-σ (FlgM)	5 x 10^{5} /8,0 x 10^{5} UFC	52	2
Xac1269 (RsbR)	4,5 x 10^{5}/3,56 x 10^{6} UFC	20	2
Xac1270 (RsbS)	2,69 x 10^{6} UFC	64	1
Xac1271 (RsbT)	6,52 x 10^{6}/1,44 x 10^{6} UFC	120	2
Xac0570 anti-anti-σ^{F}	3,20 x 10^{6}/2,34 x 10^{6} UFC	96	2

3.8 Extração do DNA plasmidial de levedura em placa

As extrações de DNA plasmidial de levedura em placa de 96 poços foram realizadas conforme protocolo Sambrook, 1989.

Em cada placa, 96 colônias positivas foram inoculadas em 2 mL de meio mínimo Sc-L e incubadas a 30°C e 250 r.p.m. por 36-48 h. Em seguida, as células foram precipitadas por centrifugação a 4°C e 2700 r.p.m. por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. O material precipitado foi ressuspendido por agitação no volume residual de meio e 1 mL de "rescue buffer" (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 10mM EDTA; 0,3% β-mercaptoetanol) foi adicionado a cada poço. Após este procedimento, a placa foi agitada por vortex e as células foram precipitadas por centrifugação a 4°C e 2700 r.p.m. por 8 minutos. O material precipitado foi então ressuspendido em 25 µL de solução de lise (2 mg/mL de zymoliase, 0,2 mg/mL de RNAse em "rescue buffer") e incubado a 37°C por 1 hora, sendo 25 µL de uma solução SDS 10% adicionada posteriormente a cada poço. A placa foi mantida em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente e um volume 100 µL de acetato de potássio 3M foi adicionado e incubado em freezer a –80°C por 15 min. Após o descongelamento, a placa foi centrifugada a 4°C e 4000 rpm por 15 minutos e 120 µL do sobrenadante foi recolhido em placa MicroAmp (Applied Biosystem, cat No. N801-0560). Para cada 120 µL, 84 µL de isopropanol foram adicionados, centrifugado a 4000 r.p.m. por 30 min, descartado o sobrenadante e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a secagem do precipitado, o DNA foi ressuspendido em 10 µL de água.

Para a análise dos clones positivos, o DNA plasmidial extraído da levedura foi transformado por eletroporação na linhagem bacteriana KC8 (*hsd*R, *leu*B600, *trp*C9830, *pyr*F:: *tn*5, *his*B463, *lac*DX74, *str*A, *gal*U,K) e plaqueadas em meio de cultura mínimo M9 (1x solução de sais, 1mM $MgSO_4$, 0,4% glicose, 0,1 mM $CaCl_2$) acrescido somente de uracil (20mg/L), histidina (20mg/L), triptofano (40mg/L) e carbenicilina (100µg/mL), no caso de

seleção de bactérias contendo do vetor pOAD. As placas foram incubadas a 37°C por 24/48 horas e o DNA plasmidial foi extraído (item 3.3 de Materiais e Métodos). Nas reações de seqüenciamento foi utilizado o oligonucleotídeo pOAD(MCS)-F 5' CAGGGATGTTTAATACCACTACAATG 3'que hibridiza no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pOAD.

Após o seqüenciamento, foram feitas as análises das seqüências no banco de dados e no sítio de *Xanthomonas* (http://genoma4.iq.usp.br), através do programa de alinhamento BLAST. As seqüências foram submetidas diretamente à análise através do programa BLASTX após a remoção da seqüência de nucleotídeos do vetor. Informações como a fase de leitura e a posição do início e final da tradução foram anotadas.

3.9 Cotransformações dos vetores pOAD e pOBD na levedura PJ69-4a

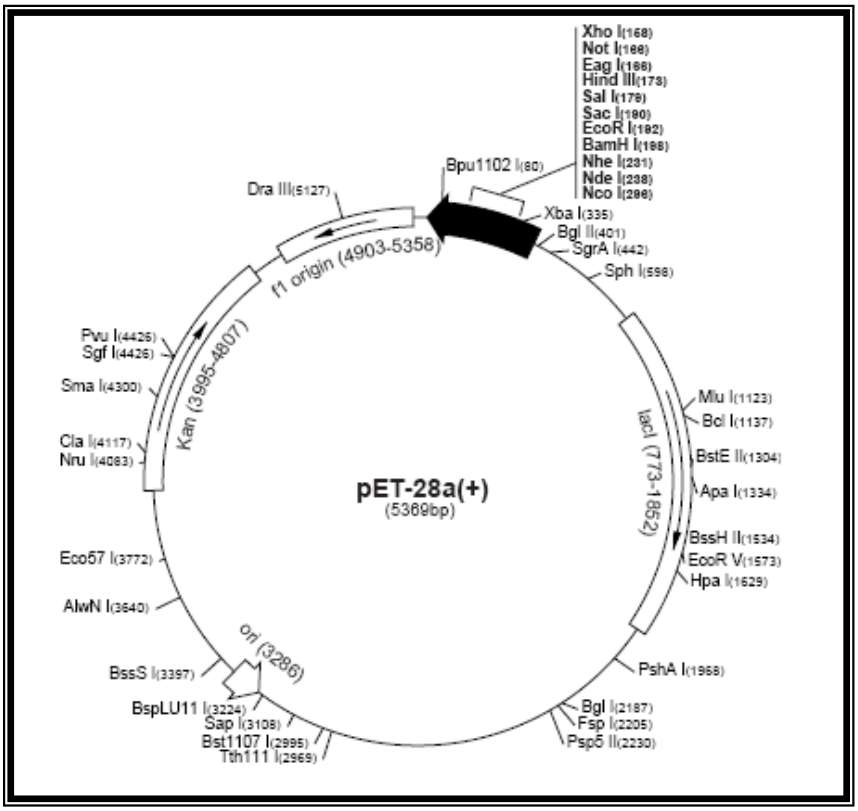
Para analisar as interações envolvendo o sistema Xac2193-Xac2192-Xac2191 e o Xac4131-Xac4130-Xac4129 os oligonucleotídeos foram sintetizados para amplificar por PCR as regiões de interesse dos genes, como descrito na Tabela 4. Os fragmentos amplificados foram clonados nos vetores pOBD e pOAD (Tabela 4). O procedimento de transformação em levedura e seleção dos clones positivos estão descrito em nos itens 3.7 e 3.8.

Tabela 4: Lista de oligonucleotídeos utilizados nas clonagens nos vetores pOAD e pOBD para os ensaios de duplo-híbrido e no vetor de expressão pET28a para a expressão das proteínas recombinantes.

Gene (Xac)	Região da proteína	Sequências dos oligonucleotídeos	Vetor clonagem e sítio de clonagem
Xac4131$_{1-168}$	N-terminal	F5`TTAATTCCATATGGCCATGGGTAGTCGCCGCATCGCC3' R5`ATATGTCGACTTAGCGCAGCGCGGCGCTGAGGCT3'	pOAD(NcoI/SalI)
Xac2193 $_{1-58}$	N-terminal	F5`TTAATTCCATATGGCCATGGTGTTGCTGCAGGACACCC3' R5`ATACGTCGACTTCGCGTGCGATGCGCGAGCCGGT3'	pOAD(NcoI/SalI)
Xac4130$_{135-356}$	C-terminal	F5`TTAATTCCATATGGCCATGGCCTGGCCGCGCACCACG3' R5`TATGGATCCCTCGAGTTACCGGTTGGCGGTCGCCGG3'	pOBD(NcoI/SalI)
Xac4130$_{1-117}$	N-terminal	F5`TTAATTCCATATGGCCATGGTGAGCGTGTCGCTGGCG3' R5`TATGGATCCCTCGAGTTAATGCCAGTGCGACCGGCGT3'	pOAD(NcoI/SalI) pET28a(NcoI/XhoI)
Xac2192$_{125-242}$	alça periplasmática	5`GGAATTCCATATGGCCATGGACCACGCCCCATCCGCAC3' R5`CATGGATCCCTCGAGTTACGGAGGCTGGGGCTTGCCA3'	pOBD (NcoI/SalI)
Xac2192$_{1-107}$	N-terminal	F5`GGAATTCCATATGGCCATGGACAGCAGGCAGATTGA3' R5`CATGGATCCCTCGAGTTACGAAAGCTTCCAGCGGCGT3'	pOAD(NcoI/SalI) pET28a(NcoI/XhoI)
Xac2191	inteira	F:5'ATGAATTCCATATGTCCAGCGCCGTCGACGAATGG3' R:5´TACCATGGTAGGATCCTTAATCTGCCTGCTGTCC3'	pET28a(NdeI/BamHI)
Xac4129	inteira	F: 5'AGCATATGTCGCACATCCAAAGCGCG3' R: 5´ACGGATCCTTACCACCACTGCGCTCC3´	pET28a(NdeI/BamHI)

3.10 Expressão de proteínas recombinantes

Para a produção de proteínas recombinantes foi utilizado o sistema de expressão pET (plasmid for Expression by T_7 RNA polimerase). O pET é um sistema otimizado para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E.coli.* Os genes de interesse são clonados sob o forte controle de um promotor do bacteriófago T_7 e a expressão é induzida através da expressão do gene da T_7 RNA polimerase na célula hospedeira. O gene que codifica a T_7 RNA polimerase no genoma da célula bacteriana BL21(DE3) e seus derivados está sob o controle de lacUV5 e a sua expressão é induzida por isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG) (Rosenberg *et al*, 1987). Os genes Xac2191, Xac2192$_{1-107,}$ Xac4129 e Xac4130$_{1-117}$ foram amplificados por PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos (Tabela 4) e clonados no vetor de expressão pET28a (Figura 16).



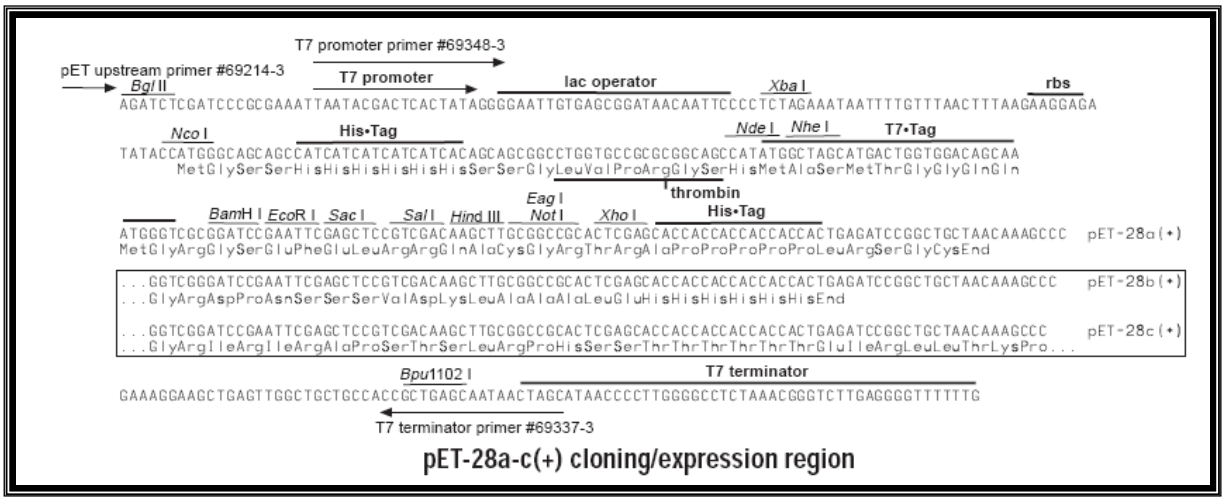


Figura 16 : Mapa do vetor pET28a(+), mostrando e o sítio múltiplo de clonagem (Novagen).

Um procedimento padrão de indução em pequena escala foi usado para testes iniciais de indução das proteínas recombinantes em *E.coli.* As linhagens de *E. coli* testadas para a expressão das proteínas recombinantes foram BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysS(RP), BL21(DE3)pLysS(Ril) e BL21(DE3)Star (Studier and Moffatt, 1986, Studier *et. al.*, 1990). Primeiramente, uma colônia isolada contendo o vetor de expressão

pET28a com o gene de interesse foi inoculada em 6 mL de meio 2xYT contendo os antibióticos necessários. As culturas foram incubadas a 37ºC e 200 r.p.m. até $O.D_{600}$ igual a 0,8. Alíquotas de 1 mL foram então retiradas e usadas como controle das amostras não induzidas. Em seguida, 0.4 mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionado para indução da expressão das proteínas. Após 4 horas de indução, alíquotas de 1 mL foram retiradas e usadas como controle de amostras induzidas. As amostras de indução e não-indução foram centrifugadas a 14000 r.p.m. por 5 minutos a temperatura ambiente, ressuspendidas em tampão de amostra (50% glicerol, 260 mM de Tris-HCl pH 6.8, SDS 10% , 0.5% azul de bromofenol e β- mercaptoetanol), fervidas durante 10 minutos e corridas em gel SDS-PAGE 15% (Sambrook et al., 1989).

Para indução de proteínas em larga escala, uma alçada de colônias transformadas com o plasmídeo de expressão foi transferida para 150 mL de 2xYT contendo os antibióticos necessários e crescida a 37ºC e 200 r.p.m. até OD_{600} igual a 0,8. Posteriormente, uma alíquota de 25 mL foi utilizada como inóculo para 500 mL de 2xYT contendo os antibióticos necessários e incubada a 37 ºC sob agitação de 200 r.p.m. até OD_{600} igual a 0,8. Após a retirada de uma alíquota de 1 mL para controle de células não induzidas, a cultura foi induzida com 0.4mM de isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) por 4 horas a 37 ºC. Um volume de 1 mL foi então retirado e as células foram coletadas por centrifugação a 4ºC e 5000 r.p.m. por 15 minutos. As amostras controles (não induzida e induzida) foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão de amostra, fervidas e corridas em gel SDS-PAGE 15% (Sambrook et al., 1989).

3.11 Purificações das proteínas recombinantes induzidas em larga escala

Todos os procedimentos cromatográficos foram realizados utilizando um aparelho de FPLC (modelo Akta GE Healthcare). Células coletadas após indução de proteínas recombinantes em larga escala foram ressuspendidas em 20 mL de tampão de lise (25 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA e 20% Sacarose) e lisadas após três passagens por uma célula em "French Press". Posteriormente, o material foi centrifugado por 45 minutos a 15000 rpm e a 4°C para separar a fração solúvel e a fração insolúvel. Ambas as frações foram analisadas por SDS-PAGE. $Xac2192_{1-107}$ e Xac 4129 foram encontradas nos corpúsculos de inclusão. Para solubilizar estas protéinas foi adicionada uréia 8M e foi mantido em todos os tampões utilizados nas etapas subseqüentes da purificação.

A solubilização de Xac2191 foi feita utilizando o detergente N-Lauroil-Sarcosil. Após a expressão de Xac2191 em larga escala, as bactérias foram centrifugadas a 4000 rpm por 15' a 4°C. O precipitado de células foi ressuspendido em 25 mL de tampão STE (20mM de Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA e 14mM 2-mercaptoetanol) para cada 1 L de larga escala. As células foram lisadas em "French Press" e aos corpúsculos de inclusão (fração insolúvel) contendo a proteína recombinante foram adicionados 0.3% N-Lauroil-Sarcosil em tampão STE sob agitação a 25°C (Zhuo et al., 2005). As amostras foram centrifugadas a 16000 rpm por 40 minutos a 4°C para obtenção do sobrenadante contendo Xac2191. O detergente foi retirado por diálise contra o tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8 e 100mM NaCl. Com retirada do detergente apenas 50% da proteína permaneceu no sobrenadante.

A purificação de Xac2191 foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel equilibrada em tampão A (20 mM Tris-HCl pH 8 e 100 mM de NaCl). As proteínas retidas na resina foram eluídas usando um gradiente de concentração de 0 mM a 500 mM de imidazol no mesmo tampão. Parte da proteína Xac2191 ficou retida na coluna, no entanto

durante a lavagem em tampão A, a proteína foi eluída com um grande grau de purificação. Para a purificação de Xac4129 também foi utilizada a cromatografia de afinidade em coluna de níquel, no entanto, a coluna foi equilibrada em tampão A (50 mM de Tris-HCl pH 8, 20 mM de imidazol, 500 mM de NaCl e 8 M de uréia) e para a eluição foi utilizado um gradiente de concentração de 20 mM a 500 mM de imidazol. O reenovelamento de Xac4129 foi feito através de diálise em tampão 50 mM de Tris-HCl pH 8 em concentrações decrescentes de uréia (6 M, 3 M e 0 M).

A purificação da região N-terminal de $Xac2192_{1-107}$ foi feita por cromatografia de troca catiônica (SP-sepharose, Amersham Bioscience) equilibrada em 50 mM de Tris-HCl pH 8, 1mM de EDTA, 8M de uréia e 14 mM de 2-mercaptoetanol. A coluna foi lavada com 100 mL desse tampão e as proteínas retidas na coluna foram eluídas utilizando um gradiente de concentração de 0 a 500 mM de NaCl no mesmo tampão. A proteína $Xac2192_{1-107}$ não ficou retida na coluna, sendo eluída juntamente com alguns contaminates durante a lavagem. Após a concentração dessa fração para 4 mL utilizando um concentrador AMICON (Ultrafiltration membranes, dia 44,5mm, NMWL 10,000, "Milipore"), a proteína foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em uma coluna de gel filtração (Superdex 75, Amersham Bioscience) equilibrada em tampão 50 mM de Tris-HCl pH 8, 1mM de EDTA, 8M de uréia, 100 mM de NaCl e 14 mM de 2-mercaptoetanol. A proteína purificada foi reenovelada através de diálises em tampão 50 mM de Tris-HCl pH 8, 10% glicerol e 2-mercaptoetanol em concentrações decrescentes de uréia (6 M, 3 M e 0 M).

3.12 *Ensaios de "Far-Western blot" ou "Overlay"*

Para estudar as interações proteína-proteína, umas das técnicas utilizadas foi *"Far-Western blot"* ou *"Overlay"*. Esta técnica é baseada no ensaio de *"Western blot"*. As proteínas recombinantes (secção 3.11) foram fracionadas em SDS-PAGE 18% e

eletrotransferidos a 350 mA para membranas de nitrocelulose em solução tampão de transferência, através de sistema de transferência úmida Biorad (Biorad Biosystems). As membranas foram incubadas com 10% (m/V) de leite desnatado Molico® em PBS-T, e após três lavagens de 10 min com PBS-T, as mesmas foram incubadas com a proteína de interesse em uma concentração de 50 μg/mL, durante 2 horas sob agitação constante e a temperatura ambiente.

Seguindo uma repetição de lavagens com PBS-T conforme descrito acima, as membranas foram incubadas com o anticorpo específico para a proteína em solução (anti-6xHis diluído 1:5000, Sigma), em leite desnatado Molico®-PBS-T 5% por 90minutos. Novamente, as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:10 000 (Sigma) em 5% leite desnatado Molico®-PBS-T por 1h, lavadas e reveladas com reagente ECL (GE Healthcare).

3.13 Produção dos nocautes não polares

3.13.1 Produção do fragmento de 2000pb para a clonagem no vetor pNPTS138

As regiões que flaqueiam os genes de interesse foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 5 (Figura 17). Em seguida os produtos de PCR foram analisados em um gel de agarose 1%, purificados, digeridos utilizando as enzimas de restrição NdeI ou NotI e ligados. Os fragmentos de 2000 pb gerados nas reações de ligação foram purificados e utilizados como molde para reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos F1 e R2 (Figura 17). O produto de PCR foi utilizado na clonagem no vetor pNPTS138 (Figura 18). Este vetor é derivado do vetor Litmus 38 que contém o marcador de resistência a kanamicina, o gene levansucrase SacB e a capacidade de se transferir por

conjugação para uma grande diversidade de bactérias. (Dickon Alley M.R.K, trabalho não publicado). Os clones foram confirmados por ensaios de restrição e por seqüenciamento.

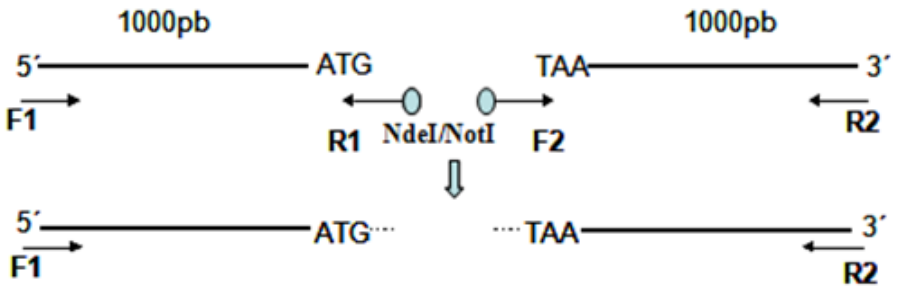


Figura 17: Esquema representando as regiões flaqueadoras dos genes selecionados para a deleção. O sítio de ligação entre as regiões e a nomenclatura utilizada para identificar a região de amplificação dos oligonucleotídeos (F1/R1 e F2/R2).

Tabela 5: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a produção dos nocautes.

Gene (Xac)	Sequência dos Oligonucleotídeos	Sítios de restrição
2191	F1 5´TACTGCAGGAATTCCTCCAGGCCTGGGCATGA3´	PstI/EcoRI
	R1 5´TAGCTTAACCATATGGACAAACCATTCGTCGACGGC3´	NdeI
	F2 5´TAGCTTAACCATATGAAGTCGACGCGCGATGGACAG3´	NdeI
	R2 5´TATCTCGAGGGATTCGGCGCGTATTGGATAG3	XhoI
2192	F1 5´ATAAAGCTTGAATTCAGGAGCACAGCCGCTGCC3´	HindIII/EcoRI
	R1 5´TAGCTTAACCATATGCGCCAGCCACTGCGC3´	NdeI
	F2 5´TAGCTTAACCATATGCGCGCCGAATCCCGC3´	NdeI
	R2 5´TATCTCGAGATAGCCGCTGGAGATCGCCAACTG3’	XhoI
4129	F1 5´CGTAAGCTTCTGGCGTCGTCGCCGGCC3´	HindIII
	R1 5´ATAATCATATGCGGCCGCGAATTCTGGATGTGCCGACAC 3´	NotI/EcoRI
	F2 5´ATAATCATATGCGGCCGCGAATTCGCGCAGTGGTGGTGA3´	NotI/EcoRI
	R2 5´ACGTGTCGACCGCAGGCCGGGCTGC3´	SalI
4130	F1 5´ATAAAGCTTGAATTCTCGCGACGCAGTTCGCGC3´	HindIII/EcoRI
	R1 5´TAGCTTAACCATATGCGCTTCCTCGGTCAGGC3´	NdeI
	F2 5´ TAGCTTAACCATATGCCGGCGACCGCCAAC3´	NdeI
	R2 5´ TATCTCGAGACGCGCTGCAGGGCTTCGGCC	XhoI
1682	F1 5´TACTAGATAAGCTTCGTCCGCCGACCTGGGGCAC 3´	HindIII
	R1 5´TAGCTTAACCATATGGCATCGCCCAGGGTGTCGGTATCA	NdeI
	F2 5´TAGCTTAACCATATGGCGGCGCCCCTTACACGGAG 3´	NdeI
	R2 5´TATCTCGAGAGCGCAATACAGGCCCAGCGAGGTGAT	XhoI
1969	F1 5´TATTCGATGAATTCCCCCGGGACTGCAGGACG3´	EcoRI
	R1 5´TAGCTTAACCATATGGCCAAGCTGGGCGGAAATGG3´	NdeI
	F2 5´TAGCTTAACCATATGACTAAACCGCTGCTTGCCCG3´	NdeI
	R2 5´TATCTCGAGTTTCCAGCAGATCCGGCGGGA3´	XhoI

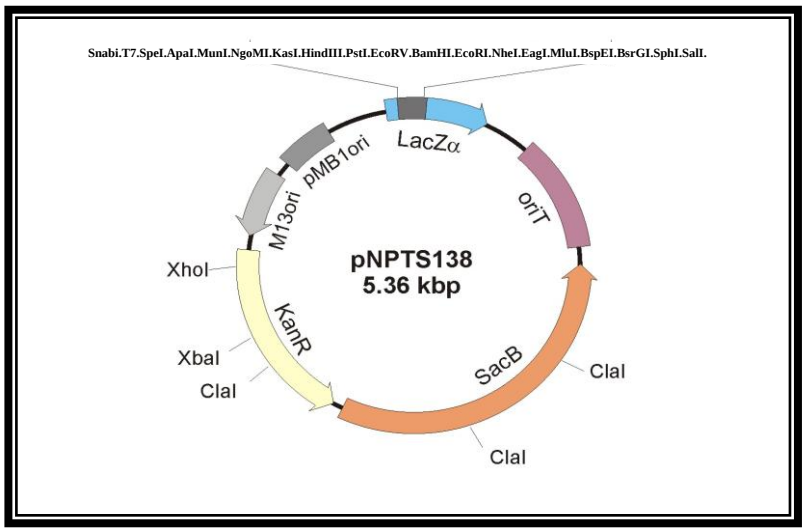


Figura 18: Mapa do vetor suicida pNPTS138 utilizado na produção dos nocautes apolares (Dickon Alley M.R.K, trabalho não publicado)

3.14 Transformação em células competentes de Xanthomonas

3.14.1 Preparo de células competentes de Xanthomonas

Dois mililitros de pré-inóculo de uma cultura saturada de *Xanthomonas axonopodis pv citri* foram transferidos em 200 mL de meio circlegrow 40 g/L (Q-BIOgene), a 28°C com agitação de 200 rpm, até atingirem DO_{600} de 0,5. A cultura de células foi centrifugada e o precipitado foi lavado três vezes com água estéril gelada. As células foram aliquotadas em 50 µL para serem transformadas.

3.14.2 Transformações das células competentes por eletroporação

A transformação das células foi realizada através da eletroporação. Em uma cubeta de 0,2 mm (GenePulser Cuvette), adicionou-se uma mistura contendo 2 µl de DNA plasmidial em 50 µl de células competentes. As condições de eletroporação foram 200 Ω, 25 µF e 2,0 kV. Após a eletroporação, foi adicionado à cubeta 800 µL de meio LB e a suspensão transferida para tubo de microcentrífuga e incubada por 3 h a 28 ^{o}C. A suspensão foi plaqueada em meio LB (10 g/L Triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl, 1% agar) contendo carbenicilina (100 µg/mL) e kanamicina (100 µg/mL) e incubada a 30 ^{o}C por 48 h.

3.15 Seleção dos clones positivos

O vetor pNPTS138 contendo um cópia mutada do gene em questão foi inserido em *Xac* por eletroporação. O plasmídeo pNPTS138 contém o gene de resistência a kanamicina e o gene de seleção *sacB de B.subtilis* que codifica a enzima levansucrase, responsável pela conversão da sacarose presente no meio em um produto tóxico para a célula. Além disso, o vetor é capaz de se replicar em *E.coli,* no entanto atua como suicida em *Xac* devido a incapacidade de replicar na célula de forma autônoma. Por isso é necessário a integração no genoma de *Xac* para permanecer na célula. Uma maneira pela qual o plasmídeo pode integrar no genoma da bactéria é através da recombinação homóloga no locus do gene alvo. Os transformantes que são resistentes a kanamicina e sensíveis a sacarose são candidatos positivos de ter sofrido esse tipo de recombinação.

Após as transformações em *Xac* as colônias que cresceram em meio LB contendo carbenicilina (100 µg/mL) e kanamicina (100 µg/mL) foram repicadas nos meios: LB/carbenicilina, LB/carbenicilina-kanamicina e LB/5% sacarose-carbenicilina. Somente as colônias que cresceram na presença de kanamicina e não cresceram em meio LB/5% sacarose-carbenicilina foram selecionadas. Essas colônias foram inoculadas em 3 mL de meio 2xTY contendo carbenicilina e crescidas a 28°C durante 24h. Para a seleção do segundo evento de recombinação foram feitas diluições dessa cultura saturada e diferentes quantidades foram plaqueadas em meios LB/carbenicilina-kanamicina, LB/5% sacarose-carbenicilina e LB/5% sacarose-carbenicilina-kanamicina. Assim, as colônias que foram capazes de crescer em presença de sacarose e que apresentaram sensibilidade a kanamicina foram selecionadas (Figura 19). Essas colônias foram repicadas novamente nos meios LB/5%sacarose-carbenicilina e LB/carbenicilina-kanamicina para certificação do fenótipo. A confirmação da deleção do gene de interesse foi feita por PCR de colônia

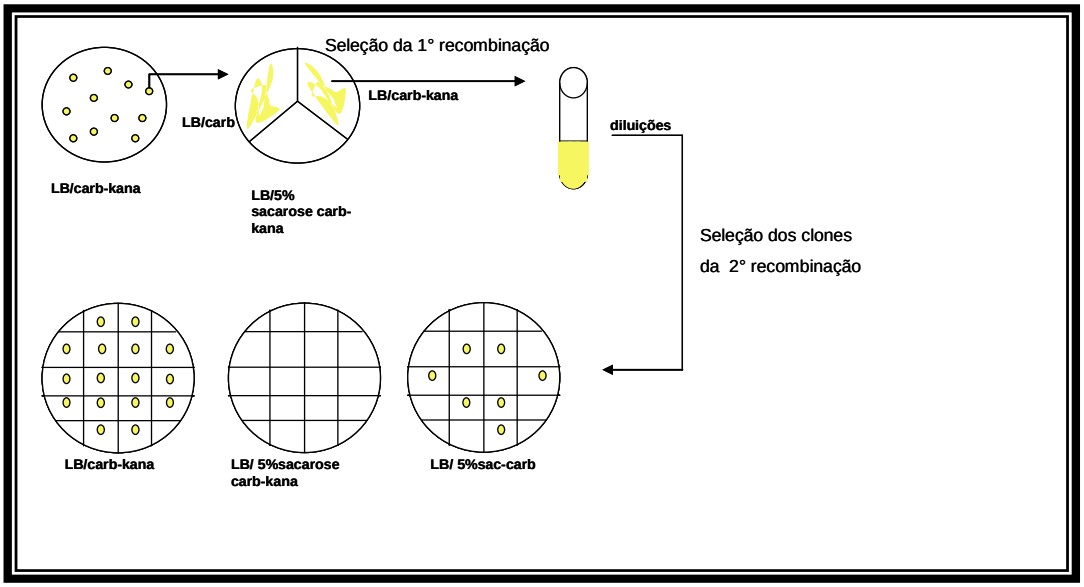


Figura 19: Representação esquemática da seleção das colônias que sofreram a dupla recombinação homóloga.

3.16 Construção do plasmídeo de expressão do gene *hrpG* em *Xac*

A complementação do gene *hrpG* na cepas Δ*hrpG* foi feita utilizando o vetor de complementação pUFR047 (De Feyter *et. al.*, 1993), que possui os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e gentamicina (Figura 20). Os oligonucleotídeos foram sintetizados para amplificar um fragmento que contém a sequência codificadora de HrpG e a região de aproximadamente 348 pb a jusante do códon de iniciação (F-348pb_upG (BamHI)5´TTAAAGGATCCCGGACCGATGTCTCTGGT3´;RcompG(HindIII)5´ATTAAA AGCTTTCAGCAGGCGGCTGCGTGAT3´). Dessa maneira foi possível amplificar gene inteiro juntamente com a região provável do promotor, totalizando um fragmento de 1140pb. A clonagem foi feita no vetor de complementação nos sítios de HindIII/BamHI. Os clones foram confirmados por seqüenciamento e por PCR de colônia. Em seguida foram transformados na cepa ΔXachrpG competente e selecionados em meio LB contendo gentamicina (100µg/mL).

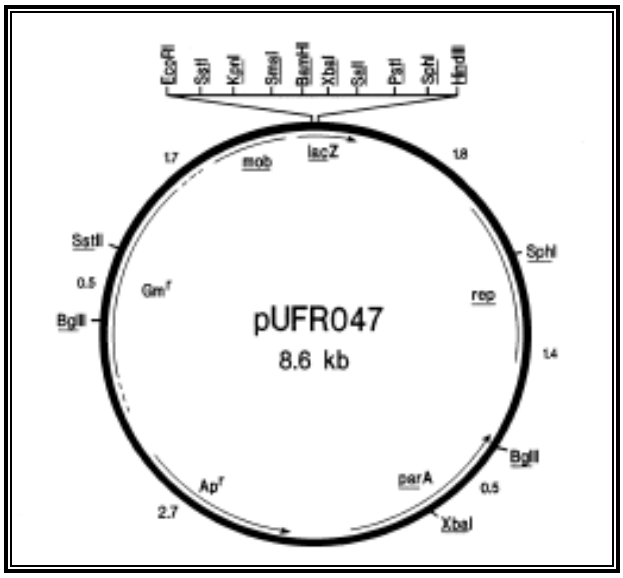


Figura 20: Mapa do vetor pUFR047 (De Feyter *et. al.*, 1993) utilizado para a complementação do gene nocauteado em *Xac*.

3.17 Ensaios de mobilidade eletroforética (EMSA)

A região de 300 pb a jusante do códon de iniciação da tradução para cada um dos genes da Tabela 6 foi amplificada por PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos indicados na Tabela 6 a partir do DNA genômico de *Xac*. O DNA foi marcado utilizando o kit de Random Primers DNA Labeling System da Invitrogen e (α-^{32}P) dATP (Amersham), que amplifica a seqüência de interesse com o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E.coli*, de acordo com o protocolo do fornecedor.

Para cada reação de ligação "in vitro", foram utilizados 1 µM da proteína Xac2191, 0,6 µL do núcleo RNA polimerase (Epicentre), 0,2 µg de ssDNAe 2 µL de DNA marcado em tampão de ligação contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de $MgCl_2$, 100 mM de KCl,1 mM de DTT e 100µg/mL de BSA (Soro de albumina bovina). Após incubação por 1 a 2 horas a temperatura ambiente e adição de 4 µL de tampão de amostra (6X), as reações foram separadas por eletroforese em gel 5% de acrilamida não desnaturante em tampão TBE 1X, seguido de secagem e exposição em "Storage Phosphor screen" (Molecular Dynamics).

Tabela 6: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar os fragmentos de 300pb utilizados nos ensaios de EMSA.

Gene (promotor)	Seqüência dos primers
Xac 1229p	F5´TATAGTCGACCCACGTGCTGCTGCGCGC3´
	R5´ACGGAATTCAACACTCCTTGGGTCACG3´
Xac 1970p	F5´TATAGTCGACCGCAACCAGCCACCCACC3´
	R5´ACGGAATTCGGCGCAGAAGAGACCTTT3´
Xac 4180p	F5´TATAGTCGACCTGGCGCGCTGACGCGCT3´
	R5´CTAGAATTCGGTGGGGCCGGGAATCGG3´
Xac 3480p	F5´TATAGTCGACTGCAGGTTGAGATGAGATGCG3
	R5´ACGGAATTCGGCGCCAAGTCTGGCACA3´
Xac 3421p	F5´TATAGTCGACATGTGCCTCCGAACGCGC3´
	R5´CTTGAATTCTTAGAGGCGAGAGCGGCCG3´
Xac 0898p	F5´TATAGTCGACACCTTGTGCGGGTTGCCG3´
	R5´ATTGAATTCAGTTTCGCTCTAGGCCG3´
Xac 2169p	F5TATAGTCGACACGCCAATGCCACCGG3´
	R5´ATTGAATTCTGGAAGTCTCCGTGGATC3´
Xac 3993p	F5´TATAGTCGACCAGGCGGTGCTGGAGATC3´
	R5´ATTGAATTCGGTCGCGCTCGTATGCATG3´
Xac 0136p	F5´TATAGTCGACGCAGATCGATGCCGACG3´
	R5´ATTGAATTCACCGGTAGTCTCGCGATC3´

3.18 Caracterizações das cepas de *Xac* mutantes

3.18.1 Teste de patogenicidade em plantas

Os testes de patogenicidade foram realizados em colaboração com o Dr. Alexandre Morais do Amaral do Laboratório de Biotecnologia Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"– IAC. As culturas bacterianas foram crescidas em meio 2xTY, a 200 rpm e 30 ºC até atingirem uma DO $_{600nm}$ de 0,3. As suspensões foram infiltradas na superfície abaxial das folhas de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), utilizando seringas de 1mL. O monitoramento e o desenvolvimento dos sintomas da infecção foram feitos através de fotografias retiradas em dias diferentes (5 a 15 dias) após a inoculação.

3.18.2 Ensaios de motilidade

Para os ensaios de motilidade foi utilizada uma superfície semi-sólida. Em meio SB (5 g/L de sacarose, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 1 g/L de ácido glutâmico pH

7,0 e 0,5% de ágar) foram inoculados 2 µL de uma cultura na fase exponencial de crescimento (10^7 cél/mL) crescida em SB à 28°C. As placas foram incubadas à 28°C durante 2 dias.

Para os ensaios de motilidade do tipo "swimming" foram utilizados tubos de ensaio de contendo 4 mL de meio XVM2 (20 mM de NaCl, 10 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM de $CaCl_2$, 0.01 mM de $FeSO_4$, 5 mM de $MgSO_4$, 0.16 mM de KH_2PO_4, 0.32 mM de K_2HPO_4, 10 mM de frutose, 10 mM de sacrose ,0,03% casaminoácido, pH 6,7 e 0,3% de ágar). As culturas na fase exponencial foram inoculadas na superfície do meio e incubadas à 28°C durante 2 dias.

3.18.3 Teste de sobrevivência a diferentes estresses (choque térmico, estresse oxidativo e presença de etanol)

Culturas de *Xac* selvagem e mutantes saturadas foram diluídas para uma DO_{600nm} 0,1 e incubadas por 4-5h até atingir a fase exponencial de crescimento (DO_{600nm} 0,5). As células foram expostas ao choque térmico de 45°C em banho-maria e alíquotas foram retiradas antes do choque e durante 20, 30 e 40 minutos após a exposição. Para os testes de sobrevivência ao estresse oxidativo as células foram expostas a 2,5 mM de H_2O_2 e alíquotas foram retiradas durante os tempos de 10, 20 e 30 minutos. As alíquotas foram diluídas e plaqueadas em meio LB e a porcentagem de sobreviventes foram obtidas a partir dos números de sobreviventes na ausência do estresse.

Para analisar a resistência ao etanol, as culturas saturadas de *Xac* selvagem e mutantes foram diluídas para DO_{600nm} 0,1 em meio LB na ausência e na presença de 1,5% etanol. O crescimento das culturas foi monitorado pela leitura da absorbância a 600nm.

3.18.4 Curva de crescimento em carência de ferro

Culturas saturadas de *Xac* selvagem e mutantes foram diluídas para um DO $_{600nm}$ 0,1 em meio LB na ausência e na presença do quelante de ferro (50µM de 2,2´dipiridil, Sigma). O crescimento das culturas foi monitorado pela leitura da absorbância a 600 nm.

3.19 Ensaios de PCR quantitativo em tempo real

Os oligonucleotídeos foram desenhados através do programa PrimerExpress (Applied Biosystems), de modo a obter produtos de PCR pequenos (em torno de 100pb) (Tabela 7). Para a extração do RNA total de *Xac* cepas selvagem e mutantes foram crescidas em 50mL de meios: LB (acrescido de 100 µg/ml de ampicilina) e XVM2 (20 mM de NaCl, 10 mM de (NH4)2SO4, 1 mM de CaCl2, 0.01 mM de FeSO4, 5 mM de MgSO4, 0.16 mM de KH2PO4, 0.32 mM de K2HPO4, 10 mM de frutose, 10 mM de sacarose e 0.03% de casaminoácidos, pH 6.7 e 100µg/ml de ampicilina) até uma DO_{600nm} 0,6. As células foram precipitadas por centrifugação e a extração do RNA total segui o protocolo sugerido pelo fabricante do kit "RNAspin Mini RNA Isolation"(GE Healthcare). A quantificação foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm e estocados a -80°C. A síntese de cDNA seguiu o protocolo do fabricante do kit "Superscript ™ III first Strand"(Invitrogen), utilizando 5 µg de RNA total foram utilizados para cada reação, 1 µL de oligos hexâmeros randômicos, 1 µL de tampão de anelamento e água DEPC para um volume final de 8 µL. A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e 1 minuto no gelo. Em seguida foi adicionado 10 µL de 2xFirst-Strand reaction mix e 2 µL de Super Script III/RNAse OUT™ mix. A síntese de cDNA foi realizada 5 minutos a 25 °C, 50 minutos a 50 °C e a terminação a 85 °C durante 5 minutos. O produto da reação foi estocado a -20 °C.

Para as reações de Real Time PCR foi utilizado o reagente SYBR® Green Dye (Applied Biosystems). Esse corante possui a afinidade por sequências pequenas de dupla fita de DNA. Quando está ligado ao DNA simples fita, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520 nm, portanto, quando ligado à dupla fita de DNA, a fluorescência aumenta aproximadamente 100 vezes, permitindo a detecção do produto de PCR em tempo real a cada ciclo de amplificação. Na reação foi utilizado 1µL de cDNA (1ng); 2,4 µL de solução contendo os primers forward e reverse na concentração final de 600 nM; 10µL de SYBR® Green mix e 6,6 µL de água Milli-Q. O SYBR® Green mix contém todos os componentes necessários para a realização das reações de amplificação. Essas reações foram feitas no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos; 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C de 15segundos e 60 °C por 1 minuto. Em todos os experimentos foram realizadas as curvas de dissociações das reações para confirmar a ausência de dímeros e de produtos inespecíficos. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schimittgen, 2001) utilizando o gene Xac4291 que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal como normalizador.

Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qRT-PCR.

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos
Xac0136	F5’CTGGCCGGCGGCTATT3’
	R 5’ATGCCCAGCTTTTCCAGGAT3’
Xac0898	F 5’ CCGCGCGGACTCACTAAC3’
	R5’GGTGCGATCTTTTACCTCAAGTTT3
Xac1229	F 5’GGCGAGCGGGTTTTCC3’
	R 5’CGTACGCCGAGCTTGGA3’
Xac1970	F 5’ATTTGGGCATCAGCGTCAAG3’
	R 5’ ACCCGAGCGACTCCATCAT3’
Xac2168	F 5’AATATCGCCGCCCATGTG3’
	R 5’CACTGCCGATCTGCTTGTTG3’
Xac3421	F 5’ATACCCAACGTCAGCAGGAAGT3’
	R 5’GTGTCCGGGTCCAGATCGT3’
Xac3480	F 5’CGATGGCCTGCTCAACAAG3’
	R 5’GCTGTAGCAGTCGAGTTTTTTCAG3’
Xac3993	F 5’CCGCCAGCGAGATTGC3’
	R 5’AGGCTTCGATGCGATTGG3’
Xac4180	F 5’TCAACAAACAGATCGCCTACGA3’
	R 5’GCCTGGGTGCGATTGGT3’
HrcU	F 5’ TTCCAGACTGGGCTGAATGC 3’
	R 5’ GGCTTCGCAACGAAAAGAGT3’
HrpG	F 5’ CCGCCGATGACAGTTCACT3’
	R 5’ CCAGAATGTTGTCTGCGCAAT3’
HrpX	F 5’ CCACGTCAGCGACGATATCTC3’
	R 5’ GCGGCCACTTCGTTGATC3’
Xac4291	F 5’GAATGAGCCGATGTCGGATT3’
(normalizador)	R 5’CTCAGTTCCAGTGTGGCTGATC3’
Xac1631	F 5’CCTGTATCAGCAGACCCAGATG3’
(normalizador)	R 5’GGATGAACGCCTCCAGCAT3’

4. Resultados

4.1 Seleção das proteínas de *Xac* para serem analisadas em ensaios de duplo-híbrido

Como foi mencionado no item Objetivos, um dos interesses desse trabalho foi realizar uma triagem de interações proteína-proteína envolvendo fatores sigma de *Xac* através do sistema duplo-híbrido em leveduras (Fields & Song, 1989, Bartel & Fields, 1995, Alegria *et al*., 2004). Após sequenciamento do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, 14 fatores sigma foram identificados (Tabela 8) (da Silva *et al*., 2000). Entre esses fatores sigma está o sigma primário codificado pelo gene *rpoD* (*Xac3788*), também conhecido como σ^{70}. Este fator sigma está presente em todas as bactérias e possui função essencial para a sobrevivência celular, uma vez que atua na ativação da transcrição de genes relacionados com o crescimento, diferenciação e divisão celular (Wosten, 1998). Além do σ^{70}, foram identificados dois fatores sigma da família σ^{54}, que em outras bactérias estão relacionados com a biossíntese de flagelo, resposta a carência de nitrogênio e virulência, e também onze fatores sigmas alternativos da família σ^{70}, que atuam na ativação da transcrição de genes específicos para um determinado estímulo, sendo considerados não essenciais para a sobrevivência (Helman & Chamberlin, 1998). Dentre esses fatores não essenciais estão nove fatores σ^{ECF}, que em outras bactérias desempenham a função de ativar a transcrição de genes em resposta a um determinado estímulo percebido no meio extracelular. Finalmente, *Xac* codifica um homólogo do fator σ^{32} (ou σ^{H}) de *E.coli*, descrito ser responsável pela resposta ao choque térmico e também um homólogo a σ^{FliA} (Tabela 8).

Após seqüenciamento do genoma, também foram identificados alguns possíveis reguladores positivos e negativos dos fatores σ. Todos os genes que codificam esses reguladores foram selecionados para triagens no sistema duplo-híbrido com a finalidade de identificar proteínas com qual elas interagem (Tabela 8).

Tabela 8: Lista dos genes selecionados para os ensaios de duplo-híbrido.

Gene	Posição no genoma (Início...Final)	Produto codificado
Xac3788	4458049...4456175	$\sigma^{70}_{Xac3788}$
Xac1933	2258953...2258169	$\sigma^{FliA}_{Xac1933}$
Xac3824	4498888...4498016	$\sigma^{32}_{Xac3824}$
Xac1969	2301869...2300469	$\sigma^{54}_{Xac1969}$
Xac2972	3474236...3475672	$\sigma^{54}_{Xac2972}$
Xac0922	1085242...1084580	$\sigma^{ECF}_{Xac0922}$
Xac1319	1524062...1524679	$\sigma^{ECF}_{Xac1319}$
Xac1380	1589024...1588464	$\sigma^{ECF}_{Xac1380}$
Xac1682	1940316...1939738	$\sigma^{ECF}_{Xac1682}$
Xac2191	2564057...2564629	$\sigma^{ECF}_{Xac2191}$
Xac2814	3302023...3302517	$\sigma^{ECF}_{Xac2814}$
Xac3989	4681452...4680940	$\sigma^{ECF}_{Xac3989}$
Xac4128	4849929...4849393	$\sigma^{ECF}_{Xac4128}$
Xac4129	4850278...4850802	$\sigma^{ECF}_{Xac4129}$
Xac1414	1630319...1628976	anti-$\sigma^{ECF}_{Xac1414}$
Xac1989	2321035...2321343	anti-$\sigma^{FlgM}_{Xac1989}$
Xac2192	2564613...2565659	anti-$\sigma^{ECF}_{Xac2192}$
Xac4130	4850802...4851869	anti-$\sigma^{ECF}_{Xac4130}$
Xac1269	1452953...1453807	Regulador positivo σ^{B}
Xac1270	1453812...1454171	Regulador negativo σ^{B}
Xac1271	1454171...1454563	Efetor negativo σ^{B}
Xac0570	671535...671119	anti-anti-σ^{F}

4.2 Análises das interações proteína-protéina através dos ensaios de duplo-híbrido de levedura

Os genes listados na Tabela 8 de cada uma das proteínas foram clonados no vetor pOBD e utilizados como isca na triagem contra uma bilblioteca de presas derivadas de DNA genômico de *Xac* (Alegria *et al*., 2004). As interações identificadas nestes ensaios de duplo-híbrido em levedura estão resumidas na Tabela 9.

Tabela 9: Resumo das interações obtidas na triagem no sistema duplo-híbrido de levedura utilizando as diferentes iscas de interesse.

Gene	Proteína (isca)	Proteína (presa)	Gene que codifica a presa	Nome do gene	Número de vezes isoladas
Xac2814 (RfaY)	$\sigma^{ECF}_{Xac2814}$	anti-$\sigma_{Xac2815}$	**Xac2815 (RfaX)**	rfaX	22
Xac3989 (PrtI)	$\sigma^{ECF}_{Xac3989}$	anti-$\sigma_{Xac3988}$	**Xac3988**	prtR	1
Xac0922	$\sigma^{ECF}_{Xac0922}$	anti-$\sigma_{Xac0921}$	**Xac0921**	-----	11
Xac4129	$\sigma^{ECF}_{Xac4129}$	anti-$\sigma_{Xac4130}$	**Xac4130**	-----	3
		Chaperona molecular DnaK	**Xac1522**	dnaK	4
Xac4130	anti-σ_{Xac413}	$\sigma^{ECF}_{Xac4129}$	**Xac4129**	-----	5
		anti-$\sigma_{Xac4130}$	**Xac4130**	-----	1
Xac2191	$\sigma^{ECF}_{Xac2191}$	anti-$\sigma_{Xac2192}$	**Xac2192**	-----	4
Xac2192	anti-$\sigma_{Xac2192}$	$\sigma^{ECF}_{Xac2191}$	**Xac2191**	-----	9
Xac4128	$\sigma^{ECF}_{Xac4128}$	Reg. diácido de carboidratos	**Xac4359**	-----	1
Xac1682	$\sigma^{ECF}_{Xac1682}$	anti-$\sigma^{ECF}_{Xac1681}$	**Xac1681**		1
Xac1380	$\sigma^{ECF}_{Xac1380}$	anti-$\sigma^{ECF}_{Xac1379}$	**Xac 1379**	----	8
Xac1319	$\sigma^{ECF}_{Xac1319}$	Proteína RhsD	**Xac2529**	rhsD	3
		Proteína hipotética com domínio GGDEF	**Xac2446**	-----	1
		Proteína de transporte	**Xac3985**	yhhT	1
		Proteína hipotética	**Xac2307**	-----	1
Xac3824	σ^{32}	Receptor- dependente TonB	**Xac4131**	-----	2
		Regulator transcricinal	**Xac2515**	-----	2
Xac1969	σ^{54}	Pirofosfato sintetase	**Xac1417**	uppS	1
		Regulador transcricional	**Xac4191**	kdgR	1
		Regulador transcricional família LysR	**Xac4350**	-----	1
		Desidrogenase monofosfato 5`iosina	**Xac2288**	guaB	1
		Proteína hipotética	**Xac0107**	-----	1
		Álcool desidrogenase	**Xac0031**	yahK	3

Xac2972	Fator σ^{54}	Prot. Reg. do sistema de dois-componentes -NtrC	**Xac0208**	ntrC	1
		Proteína hipotética	**Xac3753**	-----	3
		Sintetase fosforibosilformilglicinamidina	**Xac3549**	purL	1
		Proteína de divisão celular	**Xac2006**	ftsK	1
		Proteína hipotética	**Xac0115**	-----	1
		Regulador transcricional do regulon fosfato	**Xac1573**	phoU	1
Xac1989	Fator anti-σ^{FlgM}	$\sigma^{FliA}_{Xac1933}$	**Xac1933**	fliA	18
Xac1269	RsbR	Regulador negativo σ^{B}	**Xac1270**	rsbS	7
Xac1270	RsbS	Regulador positivoσ^{B}	**Xac1269**	rsbR	3
		Efetor negativo σ^{B}	**Xac1271**	rsbT	1
Xac1271	RsbT	Prot.histidina quinase de dois-componentes	**Xac1273**	-----	4
Xac0570	Fator anti-anti- σ	Álcool desidrogenase	**Xac0031**	yahK	3

Os resultados obtidos mostraram que muitas iscas utilizadas interagiram com proteínas de funções desconhecidas. Por outro lado, as análises das interações com proteínas de funções conhecidas possibilitaram a divisão desses resultados em quatro grupos: 1) interações envolvendo fator $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$ descrito ser responsável pela biossíntese de flagelo; 2) interações envolvendo o putativo estressomo RsbRST; 3) interações envolvendo os fatores σ^{54}; 4) interações envolvendo os fatores σ da subfamília ECF. A relevância das interações em cada um desses grupos será discutida abaixo. Os últimos dois grupos foram abordados em mais detalhes neste trabalho e por isso, serão apresentados posteriormente (secção 4.5 e 4.6, respectivamente).

4.3 Interação do fator anti-$\sigma_{Xac1989}$ e o fator $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$

O genoma de Xac codifica homólogos para o fator $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$ e para o fator anti-$\sigma_{Xac1989}$, que são responsáveis pela biossíntese de flagelo em diferentes bactérias, como *S.typhimurium, E.coli* e *Xcc* (Chicott & Hughes, 2010; Yang et al., 2009). Nos ensaios de duplo-híbrido, o fator anti-$\sigma_{Xac1989}$ interagiu com o fator $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$ (Tabela 9), indicando um mecanismo de controle da expressão gênica semelhante aos descritos na literatura.

4.4 Interações envolvendo o putativo estressomo RsbRST

O genoma de *Xac* codifica homólogos de algumas proteínas que compõem o chamado "estressomo", responsável pela ativação do fator σ^{B} em *B.subtilis* (Hecker *et al*., 2007). Nas análises de interações proteína-proteína, utilizando como isca os homólogos de RsbR (Xac1269), RsbS (Xac1270) e RsbT (Xac1271), foram verificadas interações entre RsbR (Xac1269) e RsbS (Xac1270) e entre RsbS (Xac1270) e RsbT (Xac1271), além da interação de RsbT (Xac1271) com uma proteína sensora histidina quinase (Xac1273) (Tabela 9). Também foram identificadas as interações de uma proteína histidina quinase Xac3673 com

RsbT, com um anti-anti-σ (Xac0570) e com o $\sigma^{E}_{Xac1682}$ (Tabela 9). Hipóteses sobre a possível relevância dessas interações serão abordadas na Discussão (Secção 5.3).

4.5 Caracterizações dos fatores σ^{54} de *Xac*

O genoma de *Xac* possui dois genes que codificam fatores σ^{54}, chamados de *rpoN*1 e *rpoN*2 (Xac2972 ou $\sigma^{54}_{Xac2972}$ e Xac1969 ou $\sigma^{54}_{Xac1969}$), respectivamente. A maioria das bactérias apresenta apenas uma cópia do gene *rpoN*, envolvido em diversas funções (Wosten, 1998). Poucas possuem conhecidamente dois fatores σ^{54} e, no caso de *Xac*, as funções específicas de cada homólogo ainda não foram bem definidas.

4.5.1 Interações envolvendo fatores σ^{54}observadas no sistema duplo-híbrido

Ensaios de duplo-híbrido realizados em nosso laboratório pelo doutorando Maxuel de Oliveira Andrade e o Dr. Marcos Alegria mostraram interações entre o domínio HD-GYP de RpfG (uma proteína ativadora da expressão dos genes da goma xantana, celulases, pectinases e proteases) e a proteína NtrC. Também foi observada a interação entre as proteínas RpfC e NtrB. Adicionalmente, nesse presente trabalho, foi observada a interação entre o fator $\sigma^{54}_{Xac2972}$ e NtrC (Xac0208) (Tabela 9) (Andrade *et al*, 2006). NtrB e NtrC formam um sistema de dois componentes, sendo NtrB uma proteína constituída pelos domínios PAS e quinase e NtrC uma proteína contendo os domínios regulador de resposta (RR), ativador do fator σ^{54} e de ligação ao DNA (hélice-volta-hélice –HTH) (Hisrchmam *et al*., 1985; Kustu *et al*., 1989). Essas observações sugerem que os diversos sinais “input” detectados pelos domínios sensores de RpfC, proteínas com domínio GGDEF e NtrB podem ser integrados, processados e convertidos em sinais “output” na forma de c-diGMP (2° mensageiro) ou na atividade promotora do fator σ^{54}. Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento de homólogos de NtrC com o domínio ativador do fator σ^{54} nos processos de *quorum-sensing* de

Vibrio harveyi e *Vibrio Cholerae* (Lenz *et al*., 2004). Estudos realizados com o homólogo do fator $\sigma^{54}_{Xac2972}$ em *Xanthomonas campestris vesicatoria* demonstraram que esse fator sigma é essencial para utilização de nitrato quando essa é a única fonte de nitrogênio no meio (Horns & Bonas, 1996). Em adição a essas informações, ainda resta investigar se a interação do fator $\sigma^{54}_{Xac2972}$ com NtrC (Xac0208) e a interação desta com o domínio RpfG HDGYP é capaz de desempenhar outros papéis regulatórios adicionais à regulação da via do nitrogênio em *Xanthomonas*.

Ensaios de duplo-híbrido utilizando o fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ como isca mostraram a interação da proteína com um regulador transcricional que apresenta um domínio LysR (*Xac4350*) (Tabela 9). Trabalhos recentes têm demonstrado que a família de reguladores transcricionais com o domínio LysR atua como repressores ou ativadores da transcrição de genes que codificam fatores de virulência em *Erwinia carotovora, Ralstonia solanacearum, Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia glumae* e *Vibrio cholerae* (Harris e*t al*., 1998; Cao *et al*., 2001; Kim *et al*., 2004; Kovacikova *et al.*, 2005), além de luminescência em *Vibrio harveyi* (Chatterjee *et al*., 2002), formação de flagelo em *Erwinia carotovora* e adaptação fisiológica em bactéria durante o *quorum-sensing* (Harris *et al*., 1998; Kovacikova *et al*., 2005). Interessantemente, o gene que codifica o fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ está localizado de forma adjacente a um locus de aproximadamente 20Kpb constituído por genes relacionados à formação do flagelo em *Xac* (este locus contém o gene do fator anti-$\sigma_{Xac1989}$). Dessa forma, é possível que esse fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ em *Xac* possa estar envolvido na regulação da expressão desses genes.

4.5.2 Estudo da relação do fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ na formação de flagelos

Em procariotos, a biossíntese de flagelo é um processo que envolve mais de 40 genes. *Xanthomonas campestris* pv. campestris *(Xcc)* possui um único flagelo polar que é essencial

para sua motilidade (Yang *et al*., 2009). Os fatores sigma σ^{54} (RpoN2) e σ^{28} (FliA) estão relacionados com a ativação dos genes flagelares de forma hierárquica. O nocaute de *RpoN2* de *Xcc* resultou em ausência de flagelo e alteração da motilidade (Yang *et al*., 2009). Em *Xanthomonas axonopodis pv citri (Xac)*, o gene que codifica o $\sigma^{54}_{Xac1969}$ possui 92% de identidade com RpoN2(*Xcc1935*) de *Xcc*, indicando que esse gene pode apresentar o mesmo papel em *Xac*.

Com a finalidade de investigar a participação do fator sigma $\sigma^{54}_{\mathrm{Xac1969}}$ de *Xac* no processo de biossíntese de flagelo, foi gerado um nocaute apolar do gene *Xac1969.* Iniciamos sua caracterização através de ensaios de motilidade em superfície semi-sólida (ágar). Os ensaios de motilidade realizados em meio SB contendo 0,5% de ágar mostraram um fenótipo de hipermotilidade para a cepa ΔXac1969 quando comparada com as cepas selvagem e ΔfliC, cepa nocaute do gene que codifica a flagelina, a subunidade principal do flagelo (cedida pelo doutorando Maxuel de Oliveira Andrade) (Figura 21).

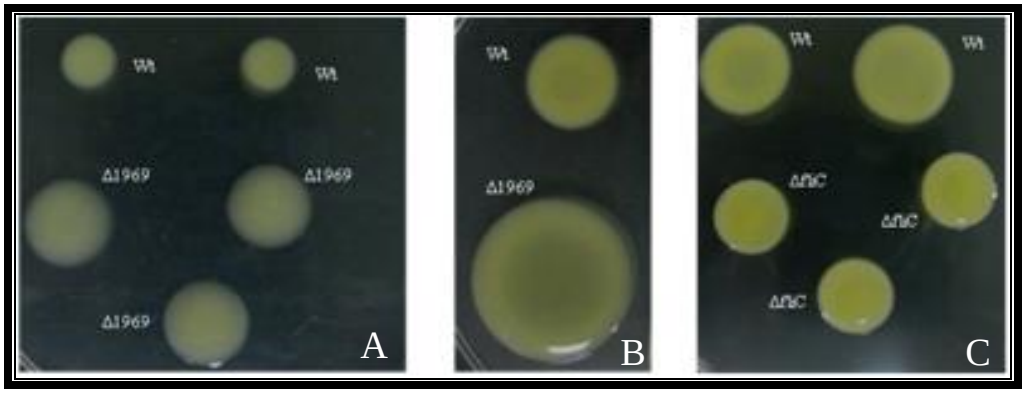


Figura 21: Ensaio de motilidade realizado com a cepa ΔXac1969 em meio SB semi-sólido contendo 0,5 % de agar. Como controle do experimento, foi utilizada a cepa mutante ΔfliC, que não apresentou total ausência da motilidade, mas somente uma pequena diminuição. A) foto retirada com 24h de crescimento. B) e C) e fotos retiradas em 48h de crescimento.

Os resultados obtidos nos ensaios de motilidade mostrados na Figura 21 foram contraditórios ao esperado para ΔXac1969. Uma característica bastante evidente dessa cepa

foi a grande quantidade de goma xantana produzida. A quantificação dessa goma foi realizada através de um ensaio de precipitação com etanol (empregando o protocolo original descrito por García-Ochoa *et al*., 1993). O resultado mostrou uma produção média de 80% a mais de goma xantana quando comparada com a cepa selvagem (Figura 22).

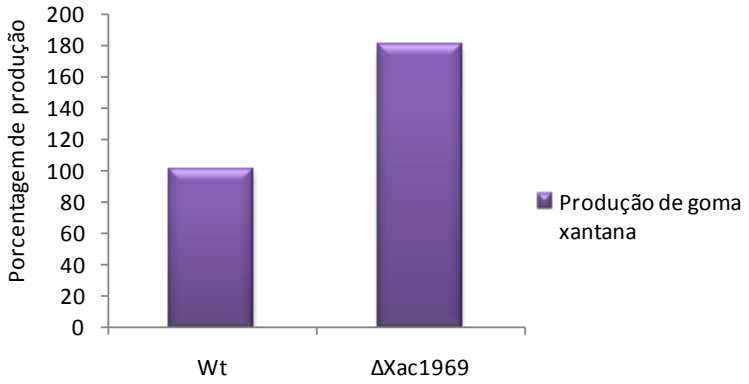


Figura 22: Quantificação da produção de goma xantana, a porcentagem foi feita em relação à cepa selvagem. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

Gotting e colaboradores (2009) analisaram a capacidade de motilidade em superfície da cepa ΔgumD, gene que codifica uma enzima glicosiltranferase participante da primeira reação química envolvida na síntese de goma xantana (Chou *et al*., 1997). Eles observaram a ausência de motilidade da cepa ΔgumD em superfícies semi-sólidas (meio SB 0,5% ágar demonstrarando, portanto, que esse tipo de motilidade de *Xac* depende diretamente ou indiretamente da produção do exopolissacarídeo goma xantana.

As bactérias utilizam uma variedade de mecanismos de motilidade para colonizar ambientes, entre eles o "swarming", mecanismo de motilidade especializado em superfície dependente de flagelo. Ao realizarmos experimentos de motilidade com a cepa mutante ΔFliC foi observada uma zona de motilidade somente um pouco menor que a cepa selvagem (Figura 21). A cepa ΔFliC apresenta hipermotilidade em meio Eiken-ágar (0,6%) (Maxuel O. Andrade, dados não mostrados). Essas observações indicam que a motilidade observada em

meio SB 0,5% ágar não é dependente da formação de flagelo e, por isso, não pode ser classificada como "swarming". Nossos resultados são consistentes com os resultados de Gotting e colaboradores (2009), e apoiam a hipótese de que o aumento de motilidade da cepa ΔXac1969 seja uma conseqüência da grande quantidade de goma e não de um aumento da atividade do flagelo.

Para analisar a motilidade da cepa sem a interferência da produção da goma xantana, foram realizados ensaios de motilidade do tipo "swimming", mecanismo de locomoção das bactérias flagelares em meio líquido. Nesse ensaio, o meio de cultura utilizado (XVM2) diminui a produção de goma. Os experimentos realizados em meio XVM2 contendo 0,3% de ágar mostraram uma diminuição de 50% da motilidade tipo "swimming" para a cepa mutante ΔXac1969 e para a cepa controle ΔfliC, quando comparadas a linhagem selvagem (Figura 23). Esse resultado indica que o fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ pode estar envolvido na ativação dos genes envolvidos na formação de flagelo, assim como tem sido observado em homólogos de outros organismos.

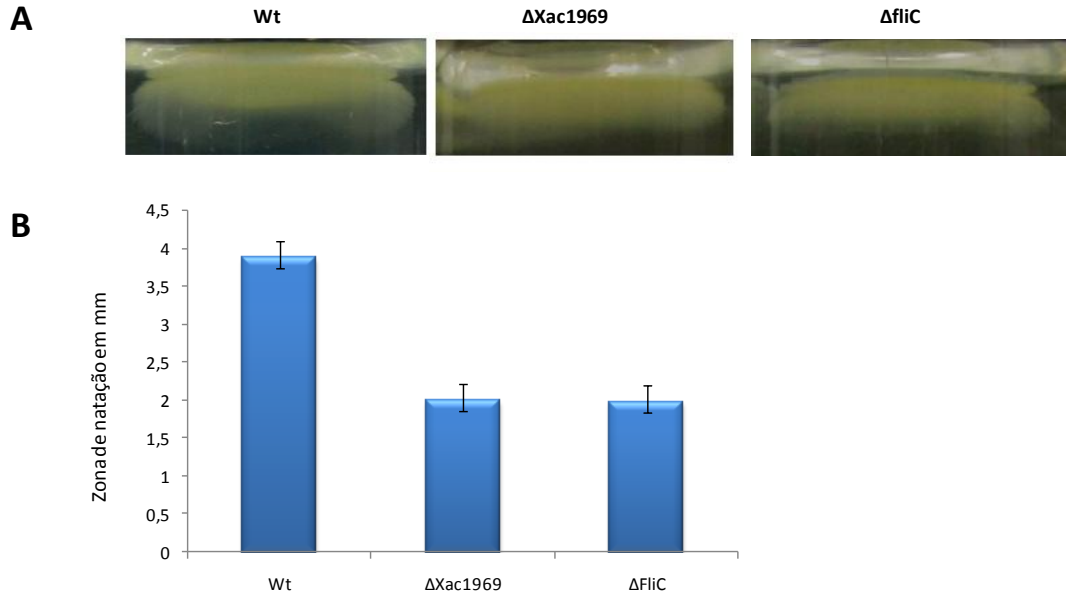


Figura 23: Ensaio de motilidade do tipo "swimming" das cepas selvagem, ΔXac1969 e ΔfliC. (A) ensaio realizado em tubos de ensaio de vidro contendo meio XVM2 com 0,3% de ágar. Fotos retiradas após 48h. (B) Gráfico representando a zona de "swimming", ou seja, a distância da motilidade em milímetros (mm). Os dados apresentados são a média de quatro experimentos independentes e o desvio padrão.

4.5.3 Estudo da relação do fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ na virulência

Em algumas bactérias, como *Pseudomonas syringae* e *Erwinia* spp., por exemplo, o fator σ^{54} tem sido relacionado com a virulência (Wei *et al*., 1992; Gaudriault *et al*., 1997; Gürlebeck *et al.*, 2006) (secção 1.7). Para testar uma possível capacidade do fator σ^{54}(Xac1969) induzir os sintomas de cancro cítrico, a cepa mutante ΔXac1969 foi inoculada em folhas de laranja pêra (ver Materiais e Métodos) e analisada quanto ao desenvolvimento dos sintomas da doença. O resultado mostrou que a cepa mutante foi capaz de desenvolver todos os sintomas do cancro, como encharcamento, hiperplasia e necrose (Figura 24).

Figura 24: Ensaio de patogenicidade da cepa ΔXac1969 realizado em folhas de laranja pêra. Fotos retiradas 15 dias após a inoculação.

4.6 Interações envolvendo fatores sigma da subfamília ECFs

Os σ^{ECFs} são fatores sigma sensíveis a sinais extracitoplasmáticos. Estes fatores são altamente diferenciados em suas estruturas primárias dos outros fatores σ^{70}. Em muitos casos, os σ^{ECFs} são cotranscritos com um ou mais reguladores negativos e freqüentemente, o regulador é uma proteína de transmembrana apresentando um domínio sensorial extracitoplasmático e um domínio inibitório que funciona como um fator anti-σ (Yoshimura *et al*, 2004). Muitas bactérias patogênicas utilizam os fatores σ^{ECF} para responder às mudanças

ambientais que elas encontram no interior do hospedeiro durante a infecção (Bashyam & Hasnain, 2004).

O genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri possui nove genes que codificam fatores σ^{ECF}, conforme mostrado na Tabela 10. Os ensaios de duplo-híbrido realizados durante esse presente trabalho, utilizando os fatores σ^{ECF} como iscas, mostraram que todo σ^{ECF} interage com proteínas produzidas por genes localizados ao lado dos genes que codificam os respectivos fatores σ^{ECF} no genoma de *Xac*. Durante o projeto genoma de *Xac*, essas proteínas foram anotadas como proteínas hipotéticas, no entanto, todas são agora consideradas prováveis fatores anti-sigma, uma vez que possuem um domínio transmembrana, característica comum dessa classe de proteínas (Figura 25). As interações observadas para cada fator σ^{ECF} estão listadas na Tabela 9 e serão descritas nas secções abaixo.

Tabela 10: Lista dos fatores σ^{ECFs} de *Xac* e seus prováveis fatores anti-σ cognatos.

Identificação no genoma	Nomenclatura	Provável fator anti-σ identificado em ensaios duplo-híbrido
Xac0922	$\sigma^{ECF}_{Xac0922}$	Xac0921
Xac1319	$\sigma^{ECF}_{Xac1319}$	Não identificado
Xac1380	$\sigma^{ECF}_{Xac1380}$	Xac1379
Xac1682	$\sigma^{ECF}_{Xac1682}$	Xac1681
Xac2191	$\sigma^{ECF}_{Xac2191}$	Xac2192
Xac2814	$\sigma^{ECF}_{Xac2814}$	Xac2815
Xac3989	$\sigma^{ECF}_{Xac3989}$	Xac3988
Xac4128	$\sigma^{ECF}_{Xac4128}$	Não identificado
Xac4129	$\sigma^{ECF}_{Xac4129}$	Xac4130

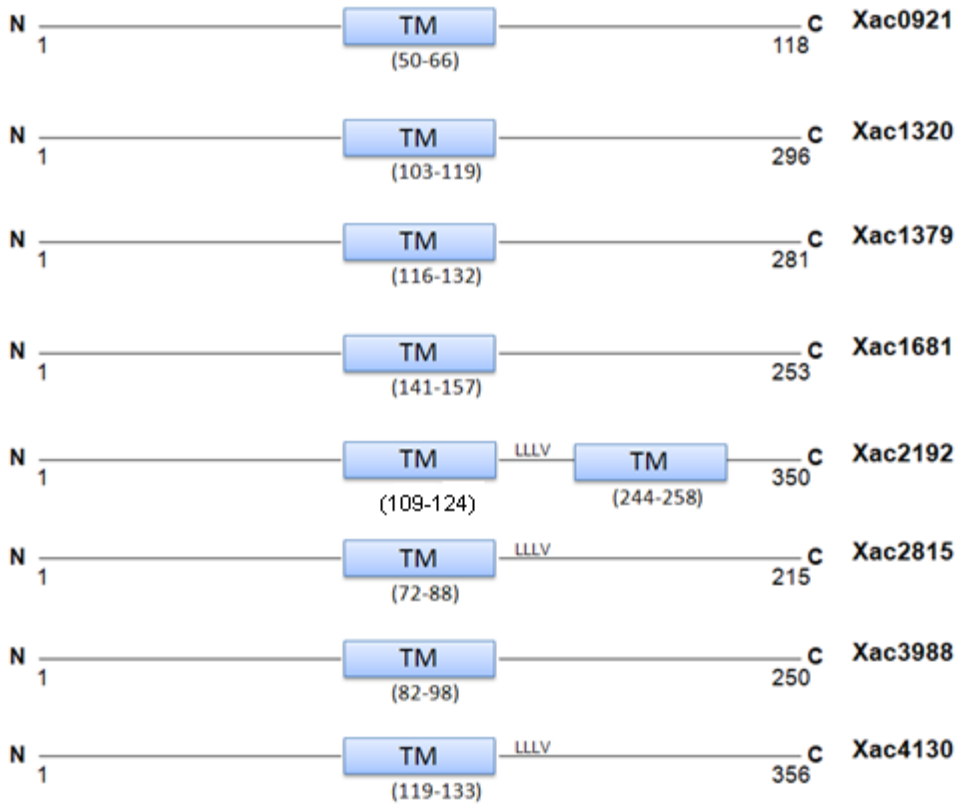


Figura 25: Representação esquemática dos domínios transmembrana (TM) dos fatores anti-σ identificados em *Xac*. Predições de localização de hélices transmembrana foram obtidas utilizando o programa PSORT.

4.6.1 Interação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2814}$ com o fator anti-$\sigma_{Xac2815}$

O $\sigma^{ECF}_{Xac2814}$ codificado pelo gene *rfaY (Xac2814)* possui 77% de identidade com *RfaY* (*Xcc2643*) de *Xanthomonas* campestris (*Xcc*). Utilizando o fator $\sigma^{ECF}_{Xac\ 2814}$ como isca no ensaio do sistema duplo-híbrido, observou-se a interação com o provável fator anti-$\sigma_{Xac2815}$, que apresenta 66% de identidade com o homólogo anti-σ^{RfaX} de *Xcc* (Tabela 9). Em *Xanthomonas campestris* (Xcc), os genes *rfaY* e *rfaX* estão localizados no locus responsável pela biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS), o componente principal da parede celular (Dow *et al.*, 1995). Em Xac, os genes *Xac2814* e *Xac2815* também estão localizados no mesmo locus. Em bactérias patogênicas, a parede celular é um importante fator de virulência, pois, protege a bactéria contra a resposta imune da célula hospedeira (Wilson *et al.*, 2002).

O mutante de *rfaX* de *Xcc* é deficiente na biossíntese de lipopolissacarídeo. A capacidade de penetração de *Xcc* pelo hidatódio é muito reduzida nas cepas mutantes de *rfaX* quando comparada com o tipo selvagem (Hugouvieux *et al.*, 1998). O mutante Δ*rfaX* de *Xcc* é conhecido por ser mais sensível a determinados compostos antimicrobianos, como novobiocina e plumbagina, no entanto, não é mais sensível ao paraquat, peróxido de hidrogênio, Tween20 e Nonidet NP40 e apresenta uma resistência ao Triton X-100 superior ao tipo selvagem (Hugouvieux *et al*., 1998).

4.6.2 Interação do $\sigma^{ECF}_{Xac3989}$ com o anti-$\sigma_{Xac3988}$, homólogos de PrtI e PrtR

Em *Pseudomonas fluorescens* a produção de proteases extracelulares em temperaturas elevadas (29°C) é dependente de ambos os genes *prtI* e *prtR.* O gene *prtI* codifica o fator σ^{ECF} e o segundo gene *prtR* codifica uma proteína de transmembrana com função de fator anti-σ (Burger *et al*., 2000). A natureza do sinal que é percebido pelo fator anti-σ^{PrtR} ainda é desconhecida, provavelmente a própria mudança de temperatura ou a presença de proteínas periplasmáticas e de membrana externa desenoveladas provocam uma mudança conformacional no PrtR. Dessa forma, PrtR libera o fator sigma e ativa a transcrição de genes que codificam proteases.

Aparentemente, ortólogos de PrtI e PrtR são encontrados em espécies dos gêneros de *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Burkolderia*. Nessas bactérias, os genes se encontram ao lado dos genes de catalase e de um dos membros da família cytb561. No ensaio de duplo-híbrido realizado, Xac3989, um homólogo de PrtI com 45% de identidade, interagiu com Xac3988, um anti-σ com um domínio transmembrana predito (resíduos 82 a 98) que apresenta 36% de identidade com PrtR de *P.fluorescens* (Tabela 9). Além disso, o códon de parada de *Xac3989* e o códon de iniciação de *Xac3988* são sobrepostos, indicando um possível controle rígido e coordenado de produção desses dois polipeptídeos em quantidades estequiométricas.

4.6.3 Interações do fator $\sigma^{ECF}_{Xac0922}$ com o fator anti-$\sigma_{Xac0921}$

Xac0922 é um fator σ^{ECF} que interagiu em ensaios de duplo-híbrido com Xac0921, uma proteína de domínio transmembrana codificada por um gene localizado ao lado de *Xac0922* no genoma (Tabela 9). A Dra.Cássia Docena em seu trabalho de doutorado identificou a interação de Xac1991 (uma histidina quinase) com o $\sigma^{ECF}_{Xac0922}$ e também com Xac1992, uma proteína que possui os domínios GGDEF, EAL e regulador de resposta. *Xac1991* e *Xac1992* estão localizados no genoma próximo ao grupo de genes responsáveis pela formação de biossíntese de flagelo (operons *fli* e *flg*). Estas observações levantam a hipótese, ainda ser testada, de que o fator $\sigma^{ECF}_{Xac0922}$ pode desempenhar função na regulação de motilidade dependente de flagelo em *Xac*.

4.6.4 Interações dos fatores σ^{E} com os fatores anti-σ

Xanthomonas possui três fatores σ^{ECF} similares aos fatores σ^{E} de *E.coli* e *P. aeruginosa* (chamado de AlgU) (Figura 26). Estas proteínas são codificadas pelos genes *Xac1319*, *Xac1380* e *Xac1682* e foram anotados como *rpoE1*, *rpoE2* e *rpoE3* (da Silva et al., 2002).

```
SigE_E.coli            -----MSEQLTDQVLVERVQKGDQKAFNLLVVRYQHKVASLVSRYVP-SGDVPDVVQEAF
SigE_P.aeruginosa      -----MLTQEQDQQLVERVQRGDKRAFDLLVLKYQHKILGLIVRFVHDAQEAQDVAQEAF
Xac1319                -MAEVDTPQELDLELVRRVQRGESAAFDVLVRKYQHRIVALIGRYIADWSECQDVAQDTF
Xac1682                MNDTDTLGDATDRMLLRRMAGGDRDALASMYHSYHGRLCRFLSRLTRRPDIIEEAINDCF
Xac1380                MSAIPGHDDDETGRLLTATAGGDRHAFEALYRQTSAKLFGVCLRMIPQRAEAEEVLQDVF
                               :     *:     *:  *:  :      ::  .  *         :. :: *

SigE_E.coli            IKAYRALDSFR-GDSAFYTWLYRIAVNTAKNYLVAQGRRPPSSDVDAIEAENFESGGALK
SigE_P.aeruginosa      IKAYRALGNFR-GDSAFYTWLYRIAINTAKNHLVARGRRPPDSDVTAEDAEFFEGDHALK
Xac1319                VRAYRAINSFR-GDAQFYTWLHRIAVNTAKNHLVAHNRRPPTDDIEISDAEQFDGATRLR
Xac1682                WIAWQKAGDFR-GDSQVSTWIMGIAYRCGLKCLRQH------------DGEAIDDTALVE
Xac1380                TLIWHKAGQFDPSRARGLTWLAMIARNKAIDHLRANAPQR-------RNVALDDAGELRA
                          ::  ..*  . :   **:  ** . . . *  .            :    :

SigE_E.coli            EISNPENLMLSEELRQIVFRTIESLPEDLRMAITLRELDGLSYEEIAAIMDCPVGTVRSR
SigE_P.aeruginosa      DIESPERAMLRDEIEATVHQTIQQLPEDLRTALTLREFEGLSYEDIATVMQCPVGTVRSR
Xac1319                DTDTPERELMRQELEQTVMRAVQALPEELRLAITLREVEGLSYDEIAQKMDCPIGTVRSR
Xac1682                DHAPSADDNDDRELRDWLDKGMERLSPDQRLVVELVYGVGHKLEEVADIMQCPVGTIKAR
Xac1380                SDASPLDRTERASTRRRIDHCLAELEPPRSELIRTAFFEGITYEELAARTDTPIGTVKSW
                       .   .       . .  : : :  *       :      * . :::*   : *:**:::

SigE_E.coli            IFRAREAIDNKVQPLIRR----------
SigE_P.aeruginosa      IFRAREAIDKALQPLLREA---------
Xac1319                IFRAREAIDIELRPLLETESATRERHRV
Xac1682                LFHARVKLRNVLPGLAGGAPYTETMQ--
Xac1380                IRRGLAKLKACLER--------------
                       : :.   :   :
```

Figura 26: Alinhamento dos fatores σ^E de *E.coli*, *P.aeruginosa* e seus homólogos mais similares em *Xac* (Xac1319, Xac1682 e Xac1380). Os alinhamentos foram produzidos utilizando o programa Clustal W.

Os fatores σ^E são caracterizados por desempenhar diversas funções em bactérias, como controle da produção de exopolissacarídeo, respostas ao estresse oxidativo, choque térmico, virulência, densidade celular e carência de nutrientes (Alba & Cross, 2004; Miticka *et al*, 2003; Flavier *et al*, 1998). Ensaios de duplo-híbrido utilizando os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac1380}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ como isca mostraram a interação com Xac1379 e Xac1681, respectivamente. Essas proteínas possuem característica comum aos anti-σ, apresentando um domínio transmembrana e 30% de identidade ao fator anti-σ RseA (Rse regulador de sigma E) de *Escherichia coli*

(Tabela 9). Embora o $\sigma^{ECF}_{Xac1319}$ não tenha interagido com o provável fator anti-$\sigma_{Xac1320}$, essa proteína possui a região N-terminal de 100 aminoácidos com grande similaridade à mesma região de RseA, no entanto, o resto da molécula não apresenta homologia com nenhuma proteína conhecida e apresenta característica de uma proteína desenovelada, com uma sequência de 25% de alanina e 12% de prolina. Desses três fatores σ^{ECF} ($\sigma^{ECF}_{Xac1319}$, $\sigma^{ECF}_{Xac1380}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$), o $\sigma^{ECF}_{Xac1319}$ é claramente o mais similar ao σ^{E} de *E.coli* (54% identidade) e AlgU de *P.aeruginosa* (62% identidade), enquanto que os outros dois apresentam identidades de somente 26% e 30%. Portanto, as observações acima sobre Xac1320 levantam questões sobre o possível papel do $\sigma^{ECF}_{Xac1319}$ e a similaridade com o mecanismo de regulação observado para os fatores σ^{E} e AlgU.

Uma vez que os fatores σ^{E} são relacionados a diversas funções importantes nas bactérias, nós decidimos gerar nocautes apolares com a finalidade de caracterizar suas funções em *Xac*. Apesar dos esforços para obter as construções no vetor pNPTS138, somente o nocaute de *Xac1682* foi obtido (ΔXac1682). O nocaute ΔXac1682 foi testado quanto a virulência, motilidade, resistência ao choque térmico e ao estresse oxidativo.

4.6.4.1 Investigação da relação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ com a virulência e motilidade

Para analisar a capacidade da cepa mutante ΔXac1682 induzir o cancro cítrico, culturas de células de *Xac* das cepas selvagem e ΔXac1682 foram inoculadas em folhas de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L. Osbeck)). A cepa ΔXac1682 apresentou o mesmo fenótipo que a cepa tipo selvagem, demonstrando que o $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ não é requerido para o desenvolvimento dos sintomas associados à doença do cancro cítrico (Figura 27).

Figura 27: Teste de patogenicidade da cepa mutante ΔXac1682 realizado em folhas de laranja pêra. A cultura da cepa de *Xac* selvagem (Wt) foi usada como controle. Foto retirada 15 dias após de infecção.

A motilidade bacteriana é considerada um fator de virulência importante para a colonização e capacidade de invasão celular de várias bactérias patogênicas. A motilidade em superfície semi-sólida da cepa ΔXac1682 foi analisada em meio SB contendo 0,5% de ágar. Os resultados mostraram motilidades equivalentes para as cepas selvagem e mutante (Figura 28).

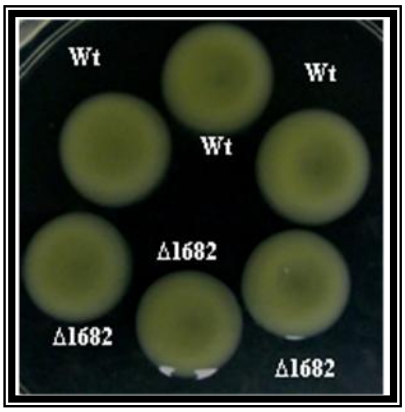


Figura 28: Ensaios de motilidade da cepa ΔXac1682 realizado em meio SB contendo 0,5% ágar. Foto retirada após 48 horas.

4.6.4.2 Investigação da participação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ na resposta aos estresses

Para determinar se o $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ é importante para *Xanthomonas* sobreviver a diferentes estresses, as culturas de *Xac* dos tipo selvagem e mutante ΔXac1682 foram submetidas ao choque térmico a 45°C por diferentes tempos e a porcentagem de

sobreviventes foi determinada (Figura 29A). Os resultados desse ensaio mostraram que a cepa mutante ΔXac1682 foi mais sensível em relação à cepa selvagem a temperaturas elevadas, indicando que o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ contribui para a proteção ao choque térmico. Esses resultados estão de acordo com o que tem sido descrito para *P.aeruginosa* e *E. coli* , onde o fator σ^{E} é envolvido na adaptação ao choque térmico (Firoved et al., 2002; Firoved & Deretic, 2003 e Alba & Gross, 2004). Em *P.aeruginosa,* o fator σ^{E} atua através da regulação do σ^{H}, o principal fator sigma de choque térmico, enquanto que em *E. coli,* o fator σ^{E} pode atuar tanto na regulação do σ^{H} quanto na ativação de genes envolvidos nas funções do envelope celular, como por exemplo, na biossíntese de lipopolissacarídeo e proteases (Dartigalongue *et al*., 2001; Rezuchova *et al.,* 2003).

Para avaliar se o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ participa da resposta ao estresse oxidativo, foram realizados ensaios de sobrevivência após a exposição a 2,5 mM de H_2O_2. Os ensaios demonstraram que a cepa mutante ΔXac1682 apresentou o mesmo perfil de sensibilidade que o tipo selvagem (Figura 29B), indicando que a adaptação da bactéria ao estresse oxidativo é independente do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682.}$

A resposta ao estresse induzida pela presença de etanol (1,5%) também foi investigada. Os resultados obtidos indicaram que a cepa mutante apresentou a mesma sensibilidade (redução da taxa de crescimento) a esse estresse que a cepa tipo selvagem (Figura 29C).

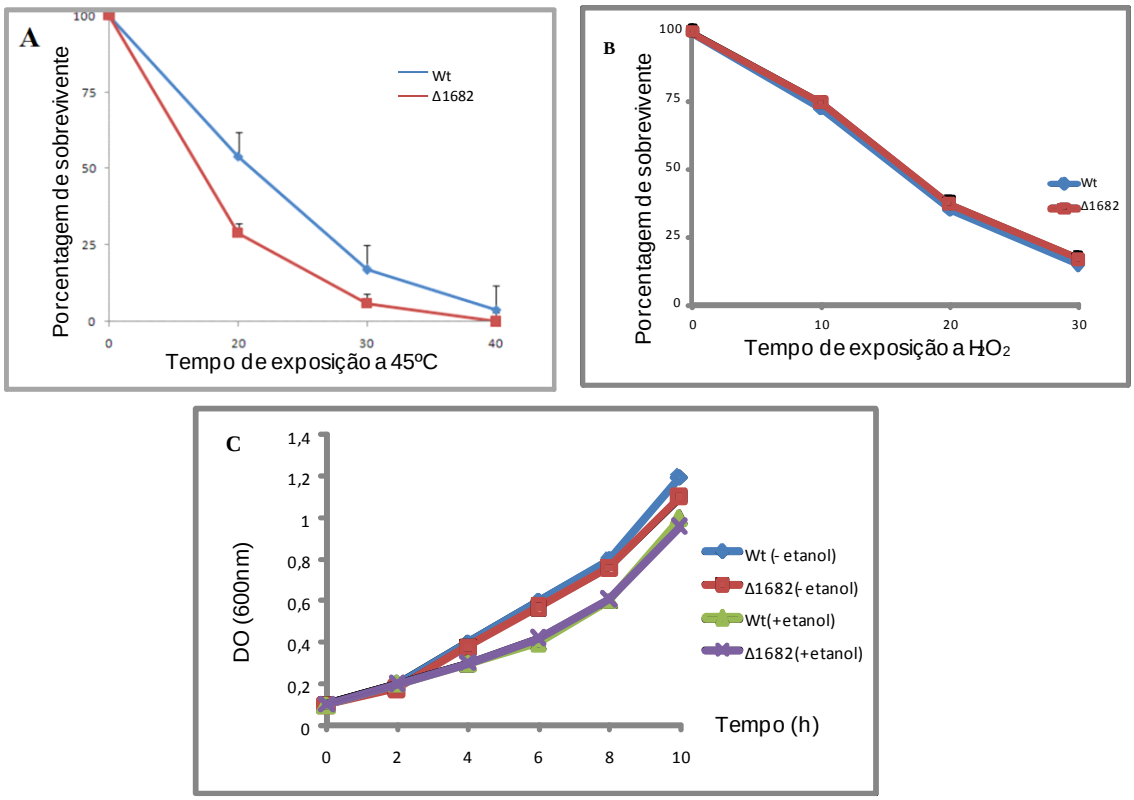


Figura 29: Investigação da resposta do nocautes do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ a diferentes tipos de estresses. (A) Gráfico representando ensaios de sobrevivência das cepas *Xac* selvagem (Wt) e mutante ΔXac1682 ao choque térmico a 45ºC. Culturas de Xac saturadas foram diluídas para uma $DO_{600nm=}$ 0,1 e incubadas por 4-5 h até atingir a fase exponencial de crescimento. Em seguinda, as células foram expostas ao choque térmico em banho maria e alíquotas foram retiradas antes do choque e durante diferentes tempos de exposição (B) Gráfico representando resultados de ensaios de sobrevivência das cepas *Xac* selvagem (Wt) e mutante ΔXac1682 ao estresse oxidativo. As culturas na fase exponencial de crescimento foram expostas a 2,5 mM de H_2O_2 e alíquotas foram retiradas antes e durante a exposição. A porcentagem de sobreviventes foi calculada com referência ao número de sobreviventes na ausência do estresse. (C) Gráfico representando as curvas de crescimento das cepas Xac Wt e mutante ΔXac1682 em meio LB na ausência e na presença de 1,5% de etanol. Os gráficos apresentam médias de medidas obtidas em três experimentos independentes.

4.6.5. Interações dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ com os fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$

Em *Xanthomonas axonopodis pv citri*, a proteína Xac2191 é um fator sigma ECF que possui 38% de similaridade com PrhI de *Ralstonia solanacearum* e 47% de similaridade com FecI de *E.coli*, enquanto que o fator anti-σ Xac2192 possui 31% de similaridade com PrhR de *Ralstonia solanacearum* e 46% de similaridade com FecR de *E.coli*. A proteína Xac4129 também é um fator sigma ECF com 42% de similaridade com PrhI e 49% de similaridade com FecI, enquanto que o fator anti-σ Xac 4130 apresenta 46% de similaridade com PrhR e com FecR.

Como descrito na Introdução, em *Ralstonia solanacearum* a proteína sensora, o fator sigma e o fator anti-sigma PrhA-PrhI-PrhR constituem uma via de transdução de sinal que controla a expressão do sistema de secreção do tipo III (Aldon *et al*., 2000), enquanto que em *E.coli,* o complexo ortólogo FecA-FecI-FecR possui a função de sinalização de carência de ferro (Braun *et al*., 2003). Em ensaios de duplo-híbrido, foram observadas interações entre as proteínas $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e anti-$\sigma_{Xac2192}$ e entre as proteínas $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ (Tabela 9). Dessa forma, foi decidido realizar uma investigação mais detalhada da função desses genes de *Xanthomonas axonopodis pv citri* com o intuito de verificar uma possível relação dos mesmos com a cascata de ativação dos genes *hrp* ("hypersensitive response and pathogenicity") do sistema de secreção tipo III(TTSS) e/ou com o processo de captação de ferro numa situação de carência desse elemento químico.

4.6.5.1 Organização genômica e identificação das regiões conservadas dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$

Em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, os genes *Xac2191*, *Xac2192*, *Xac2193* e *Xac4129*, *Xac4130* e *Xac4131* apresentam a mesma organização genômica de *FecIR* e *FecA* em *E.coli* (Figura 30).

Os fatores sigma ECFs possuem as regiões conservadas dos fatores sigma principais. A região 2 é a mais conservada e possui grande importância tanto para o reconhecimento da RNA polimerase quanto para o reconhecimento de regiões específicas no promotor. Um alinhamento dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ com a região 2 de outros fatores sigma conhecidos foi realizado com a finalidade de identificar a região 2 dos fatores de Xac. O resultado mostrou que a região 2 do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ compreende os resíduos de aminoácidos de 8 a 82 e a região 2 do fator $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ os resíduos de 8 a 80 (Figura 31). Quando foi comparada somente a seqüência correspondente à região 2 dos fatores sigma PrhI, FecI, Xac2191 e Xac4129, alguns resíduos altamente conservados foram identificados em Xac2191 (L20, D36, P57, L61, A65 e R75) e em Xac4129 (L20, D35, P58, L62, A66 e R76) (Figura 31). Esses dados fortalecem a hipótese de que os fatores sigma $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ podem desempenhar funções similares aos seus homólogos de *E.coli* e de *R.solanacearum.*

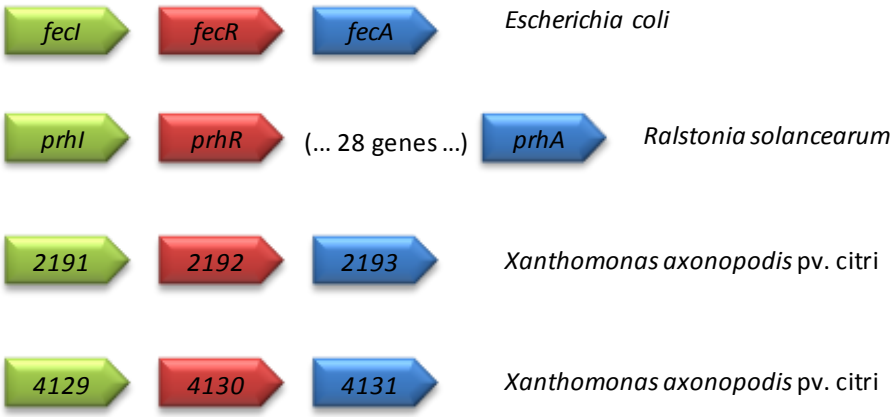


Figura 30: Comparação da organização gênica do sistema *fecIR fecA* de *E.coli*, *prhIR prhA* de *R.solanacearum* e os homólogos em *Xac.*

```
PrhI          -MQQACLPATEVASDWFRQHYAWLAGRMGRKTGCRFGAEDLASEAFAQLLQMPDWQG--T 57
FecI          MSDRATTTASLTFESLYGTHHGWLKSWLTRKLQSAFDADDIAQDTFLRVMVSETLST--I 58
PupI          -MLPSSDPLLCDVALLYRQQHSWLTRWLRQRLNCSQSAADLAQDTFIRLLNKEQVPQ--L 57
XAC4129       ----MSAHPKRAWARLFTEHGPVLRGFFVRR-GANEDAEDLVQETYLRLLRAHQQPGQAI 55
XAC2191       ----MSSAVDEWFVQHILIHETALVAYLRRCWPNPDDVHDLRQEVYARVYESASRQLP-- 54
                                  :   *   : :      .. *: .:.: ::
PrhI         REPRALLTTIAQRLLYDIWRRRDLELAYQAWAAAQPEATLP--SPEERALVLEALATIDR 115
FecI         RDPRSFLCTIAKRVMVDLFRRNALEKAYLEMLALMPEGGAP--SPEERESQLETLQLLDS 116
PupI         HAPRTFLAKVAQSVLCNHYRRQKLERAYLEALAMLPEPVVP--SLETQAILLETLIALDA 115
XAC4129      ANPEAYLYTVAVNLAREQAARRRQAPLRIEDMEQFAQRLVAGDDVEDSAQRQQRQQRLQT 115
XAC2191      DIPRAFLFSTANHLVTDRIRRSRVVSIEAVGDPDALLVLVEECTPERWMGGRQLLARLTH 114
               *.: * . *  :  :   *                        *      :    :
PrhI         LLDGLPVKARTAFLYSQLDGLTYPEIAGRLNVSVRMVQKYMTQAMRLCYLAGVS------ 169
FecI         MLDGLNGKTREAFLLSQLDGLTYSEIAHKLGVSISSVKKYVAKAVEHCLLFRLEYGL--- 173
PupI         ALDGLERPVREAFLLSQVDGLGHTEIAQRLAVSVTTVKRYIIKAGALCIMLDHSLDLP-- 173
XAC4129      VLAGLPERVRAVLVMQYRDGLSYKQIAERLGVSSHMVKKYVVRGLSACRSALADEGAQWW 175
XAC2191      AFDRLPDRCREVVWLRRVQELSQKEVAVHLGISEKTVEKHMAKGIRLLADYFHGSAAPPL 174
              :  *    * ..     : *   ::* :* :*   *:::: :.
PrhI          -----------------
FecI          -----------------
PupI          -----------------
XAC4129       -----------------
XAC2191       AAPATALKSTRDGQQAD 191
```

Figura 31: Alinhamento dos fatores σ Xac4129 e Xac2191 e seus homólogos PrhI, FecI e PupI. Na figura, as regiões destacadas em roxo representam os resíduos altamente conservados. Os alinhamentos foram produzidos utilizando o programa Clustal W.

4.6.5.2 Identificações dos domínios transmembrana presentes nos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$

Como todo fator anti-sigma, PrhR possui um domínio transmembrana que corresponde aos aminoácidos de 88 a 104 e FecR possui um domínio transmembrana que corresponde aos aminoáciodos de 61 a 76 (Figura 32). Para verificar a existência de um possível domínio transmembrana presente nos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$, foi utilizado o programa PSORT (www.psort.org), que identificou dois domínios para o anti-$\sigma_{Xac2192}$, correspondendo aos aminoácidos de 109 a 124 e de 244 a 258. Para o anti-$\sigma_{Xac4130}$, apenas um domínio transmembrana foi identificado, que corresponde os resíduos de 119 a 133 (Figuras 25 e 32).

Os domínios identificados nos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ compreendem 16 resíduos de aminoácidos e estão localizados no alinhamento na mesma região (Figura 32).

Estudos realizados em *E.coli* revelaram que a região N-terminal do fator anti-sigma FecR interage com o fator sigma FecI (Enz *et al*, 2000). Além disso, resíduos de aminoácidos específicos (motivo LLLV) presentes no domínio periplasmático de FecR são importantes para a interação com a proteína sensora FecA (Enz *et al*, 2000). Este motivo LLLV é aparentemente importante para as interações de fatores anti-σ com os domínios de sinalização de receptores dependentes de TonB. Considerando a grande similaridade entre PrhR, FecR, Xac2192 e Xac4130, um alinhamento das sequências primárias dessas proteínas foi realizado no programa ClustalW e a presença do motivo de leucina (LLLV) em Xac2192 e Xac4130 foi identificada (Figura 33). A mesma análise foi realizada com os outros fatores anti-σ, no entanto, só foi identificado o motivo LLLV no fator anti-$\sigma_{Xac2815}$ (Figura 25), reforçando a hipótese de que o motivo LLLV é importante para o mecanismo de sinalização dependente de TonB.

Dessa forma, os resultados dos alinhamentos mostrando a presença do domínio de transmenbrana e também do motivo de LLLV indicam que as proteínas Xac2192 e Xac4130 devem atuar como fatores anti-sigma e responder a sinais mediados por receptores dependentes de TonB. Baseando-se em todas essas análises, podemos especular que o mecanismo de transdução de sinal entre a protéina sensora e esses fatores devem ocorrer de forma similar ao que tem sido descrito para o sistema Fec e Prh em *E.coli* e *R. solanacearum* (Enz *et al*, 2000; Brito *et al.*, 2002).

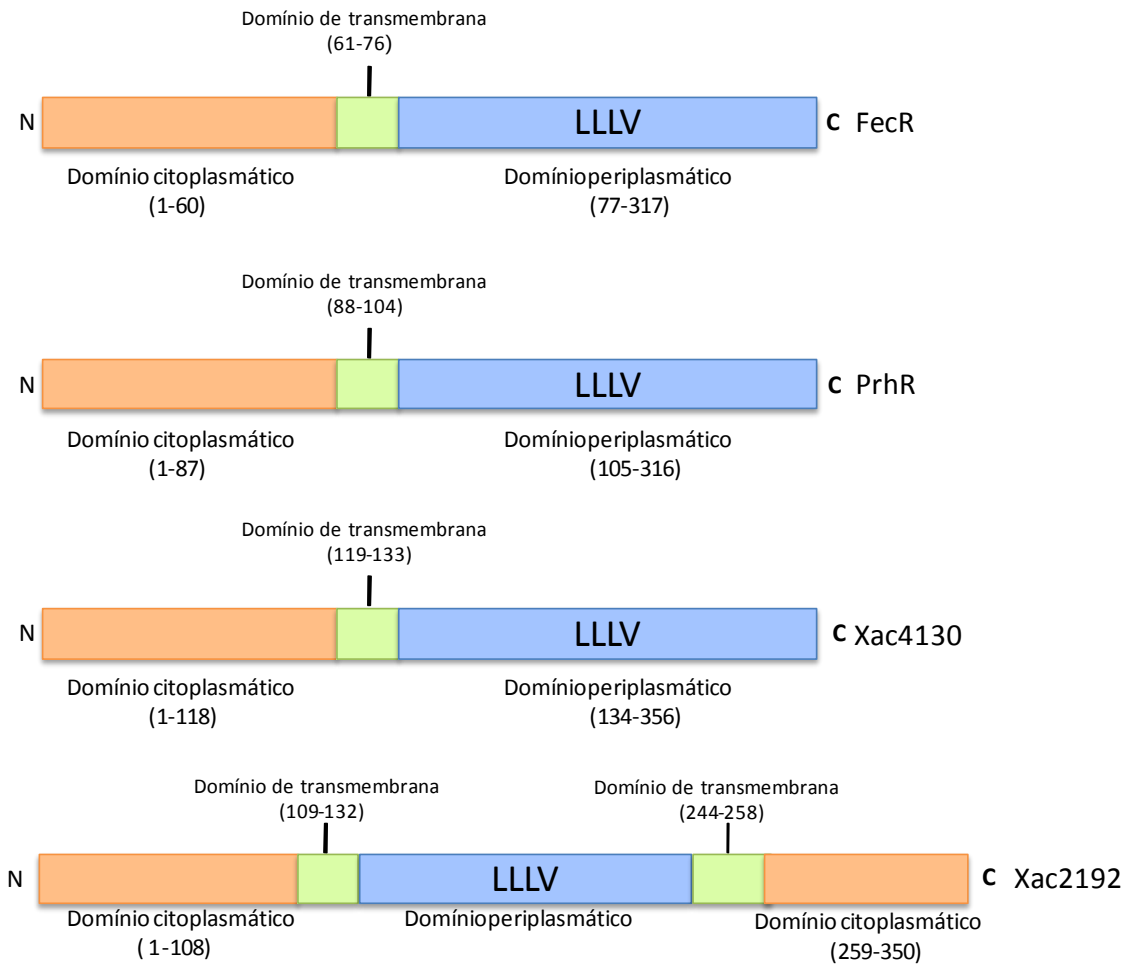


Figura 32: Representação das estruturas primárias dos fatores anti-σ FecR (*E.coli*), PrhR (*R.solanacearum*), Xac4130 e Xac2192 (*Xac*). O domínio citoplasmático está representado em laranja, o domínio periplasmático em azul e o domínio transmembrana em verde.

```
Xac2192         ------MDSRQIEHAAAQWLARRESEPWDASDQLQLDAWLAQSTAHRVAFLRLEAAWRET
Xac4130         -MSVASLAARRLTEEAAHWHALQRMQPLDADQQARFMDWLTASPAHVREYLAVTQVAGAL
FecR            MNPLLTDSRRQALRSASHWYAVLSGERVSPQQEARWQQWYEQDQDNQWAWQQVENLRNQL
PrhR            ---MKQPLNDRIAEQAIQWLVLLRSGMASEADRQRFAAWREANPAHAEAVRRLEGGLGAV
                          :  . * :* .       .  :. :   *   .  :      :

Xac2192         GR-LSAIAAGLPRGGPPARGRFTGRALPAAARGKSAHARPASHAVQHKRRWKLSLAVALA
Xac4130         GEALDAMALDVEALLQAERQRDTGTARNVVALP-LPPRRPVAARGTARSRSAARRSHWHV
FecR            GG----------------------------------VPGDVASRALHDTRLTRRHVMKGL
PrhR            ALP---------------------------SVPMPHRQAARRLLDTPPSSPMQHARRALL
                .

Xac2192         GGITIAGALFLDHAPSAQRQQAHAYQSPPGALRSLSLADGSRSTLGSDTRISVELGRHER
Xac4130         GLAAMLGLLTVLGGWAWPR--TTTYATAHGEQRRVQLADRSVVFLDADTRIQATMSPWSR
FecR            LLLLGAGGGWQLWQSETGEGLRADYRTAKGTVSRQQLEDGSLLTLNTQSAADVRFDAHQR
PrhR            VGGLGAGVAALVDLHMPLSDLAADMRTATSERRDFKLAGGHELRLNARSAVDVVPVVHGY
                      *                   :. .     .* .     *.: :  ..

Xac2192         HIALQRGEAFFEVAKDRH-RPFVVQVGARRVVAVGTQFSVRRDADELRVVVTEGTVRLDA
Xac4130         HLQLLQGQASFDVARDR--RPLQVRVLDLRVEDIGTAFDIALHGQQARIDVSAGRVHVWR
FecR            TVRLWYGEIAITTAKDALQRPFRVLTRQGQLTALGTEFTVRQQDNFTQLDVQQHAVEVLL
PrhR            DVRLRRG--SVLAMAGAWERLRVTSPVGTAECARGMLCASLDAQGRMIVAVLDGSAALSA
                 : *  *   . .  .   *   .          *             : *    . :

Xac2192         DPKDGKPQPPVLVAAGGIAVAGPHGVLVRSSTIAEAEQQVDWRSGYLSFTDAPLRDAVAE
Xac4130         ADR---PAQPMLANLGAGQSARIDGAGQVELSNEDVATMHAWQQQRIVFRDEPLRNVAED
FecR            ASA---PAQKRIVNAGESLQFSASEFGAVKPLDD---ESTSWTKDILSFSDKPLGEVIAT
PrhR            PEG-----AVTVVHSGGVHRFGPAGIEPLRRSAR---SVAAWTQGMVEVEHRPLADVIDA
                          :.  *                        * .  : . . ** :.

Xac2192         FNRFNTRPLVLADAQLGELRIGGRFSWRNTEGFARLLEHSYPIRAESRAGQMILHAR---
Xac4130         FNRLNRIQLHIDDARAGAMRLTGNLRSDDLAGLRAFLARQPGLRLEQHADALHIVSHAPP
FecR            LTRYRNGVLRCDPAVAG-LRLSGTFPLKNTDAILNVIAQTLPVKIQSITRYWINISPL--
PrhR            LRPYHAGMIEVQPSAAS-MHVTGRFPLDPRRALQMLVD-TLPLDVRYIAGLWVRISRL--
                :   .   :    :  . ::: * :      .:  .:     :  .  :      :

Xac2192         -----
Xac4130         ATANR
FecR            -----
PrhR            -----
```

Figura 33: Alinhamento dos fatores anti-sigma Xac2192 e Xac4130 com os homólgos FecR (*E.coli*). e PrhR (*R.solacearum*). A região destacada em amarelo representa as regiões transmembrana e o destaque em roxo os resíduos LLLV conservados. Alinhamentos produzidos utilizando o programa Clustal W

4.6.5.3 Análise das proteínas sensoras Xac2193 e Xac4131 em comparação com as proteínas FecA de *E.coli* e PrhA de *R.solanacearum*

As proteínas sensoras Xac2193 e Xac4131 são homólogas as proteínas FecA e PrhA de *E.coli* e *R.solanceraum*, respectivamente. Essas proteínas pertencem à família de proteínas sensoras/receptores da família TonB (Kobnik, 2005). Esses receptores estão envolvidos no transporte e na transdução de sinal percebida na membrana externa da bactéria. A sua arquitetura possui três regiões importantes: uma extensão N-terminal, o "plug" e o barril (Kobnik, 2005). As análises de Xac2193 e Xac4131 realizadas através do programa Pfam (www.sanger.ac.uk) identificaram duas regiões em comum: o "plug", que corresponde ao resíduos de aminoácidos de 59 a 186 em Xac2193 e os resíduos de aminoácidos de 160 a 281 em Xac4131 e o barril, que correspondem aos resíduos de aminoácidos de 603 a 936 de Xac2193 e de 717 a 983 em Xac4131. Além dessas regiões, Xac4131 possui uma extensão da região N-terminal (STN) (Figura 34). Em comparação com as proteínas FecA e PrhA, Xac4131 possui a mesma arquitetura de FecA, incluindo a região STN. Já Xac2193 apresenta a mesma arquitetura de PrhA. (Figura 34).

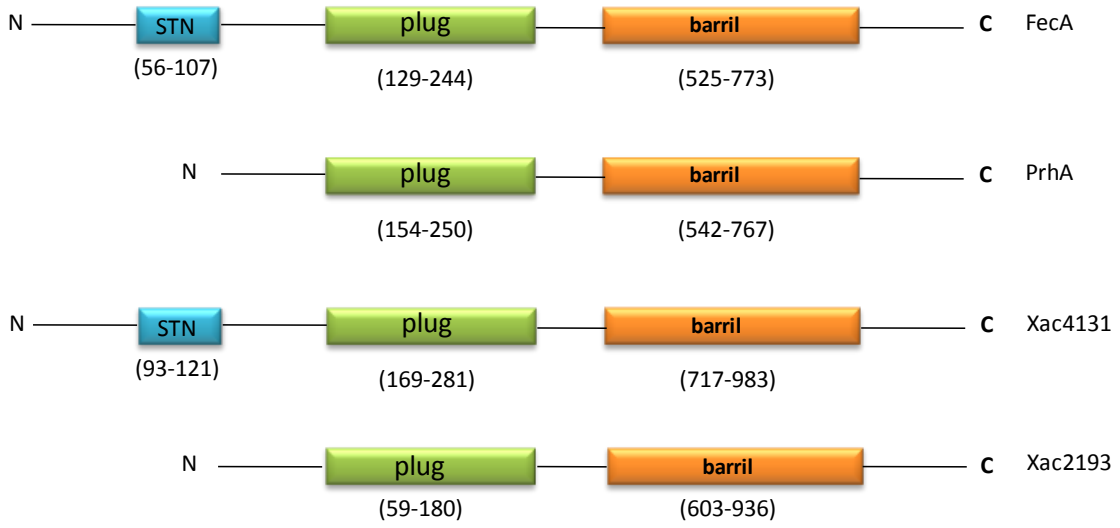


Figura 34: Representação das estruturas primárias dos receptores dependentes de TonB, FecA (*E.coli*), PrhA (*R.solanacearum*), Xac4131 e Xac2193 (*Xac*). O domínio "plug" está representado em verde e o domínio "barril", presente em receptores dependente de TonB, em laranja. STN: extensão do N-terminal de Xac4131.

Como já foi descrito na Introdução (secção 1.4.1), o mecanismo de transdução de sinal envolvendo FecARI de *E.coli* ocorre através de uma série de interações proteína–proteína, ou seja, durante o mecanismo de captação de ferro, a região N-terminal de FecA interage com a região C-terminal de FecR (região periplasmática que contém o motivo LLLV) e a região N-terminal de FecR interage com o fator σ FecI. Dessa forma, baseando-se nas análises descritas acima, uma hipótese a ser testada é se os mesmos tipos de interacões proteína-proteína ocorrem com os homólogos em *Xac.* Para checar essa possibilidade, fragmentos correspondendo às regiões N-terminais de Xac2193 (resíduos 1-58) e de Xac4131 (resíduos 1-68 no) foram clonados no vetor pOAD e os fragmentos periplasmáticos dos anti-$\sigma_{Xac2192}$ (resíduos 125-242) e do anti-$\sigma_{Xac4130}$ (resíduos 135-356) foram clonados no vetor pOBD. Ensaios de duplo-híbrido foram feitos com a finalidade de checar as interações das regiões N-terminal de $Xac2193_{1-58}$ e de $Xac4131_{1-68}$ com as regiões periplasmáticas dos fatores anti-σ $Xac2192_{125-242}$ e $Xac4130_{135-356}$, respectivamente. No entanto, nenhuma interação foi observada. Os resultados dos ensaios mostraram interações das regiões N-terminal dos fatores anti-σ $Xac2192_{1-107}$ e $Xac4130_{1-117}$ com os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$, respectivamente (Figura 35). Dessa forma podemos concluir que o mecanismo de tradução de sinal envolvendo fator anti-σ e fator σ em *Xac* pode ocorrer de forma similar ao observado em *E. coli* e também em outros organismos (Figura 36).

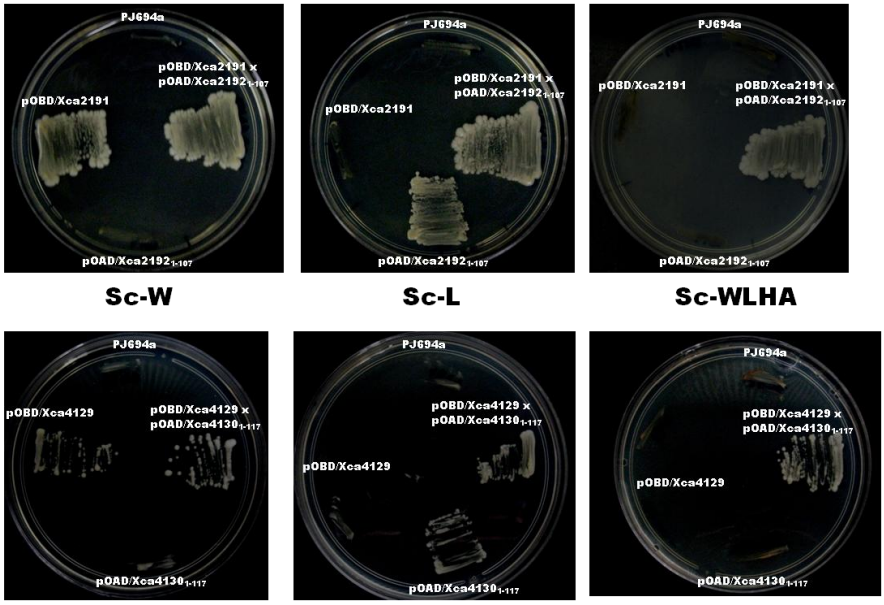


Figura 35: Ensaios de duplo-híbrido realizados para confirmar as interações observadas em ensaios de triagem utilizando a biblioteca genômicade *Xac.* (Sc-W) placa contendo meio de cultura Sc sem triptofano. Neste caso, somente as cepas de levedura contendo o vetor pOBD são capazes de crescer. (Sc-L) placa contendo meio de cultura sem leucina, onde somente a cepa de levedura contendo o vetor pOAD é capaz de crescer. (Sc-WLHA) placa contendo meio de cultura SC sem triptofano, leucina, histidina e adenina. Neste caso, só é capaz de crescer a cepa que contém a interação positiva da região N-terminal do fator anti-σ com o fator σ.

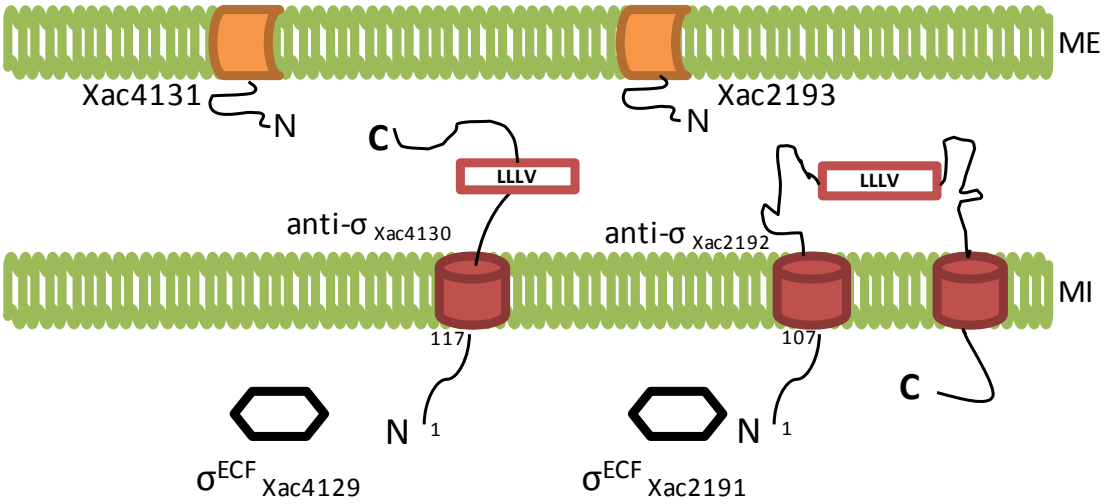


Figura 36: Representação esquemática das interações observadas nos ensaios de duplo-híbrido. Na membrana externa estão representadas as proteínas homólogas à proteína sensora FecA de *E.coli* (Xac4131 e Xac2193) e na membrana interna os fatores anti σ (Xac4130 e Xac2192).

4.6.5.4 Análise das interações entre Xac2191-Xac2192$_{1-107}$ e entre Xac4129-Xac4130$_{1-117}$ "in vitro"

Para confirmação "in vitro"das interações obtidas no sistema duplo-híbrido, o gene *Xac2191* que codifica o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ (23 KDa) e a sequência que codifica a região N-terminal de Xac2192$_{1-107}$ (11,8 KDa) foram clonados no vetor pET28a. Após ensaios de mini-indução em diferentes cepas de *E.coli*, optamos pela BL21(DE3)RP para as expressões em larga escala.

Após indução da expressão e lise, $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ foi encontrada nos corpúsculos de inclusão. Para solubilizá-la, o precipitado dos corpúsculos de inclusão foi tratado com N-lauroil-sarcosine (protocolo descrito em Materiais e Métodos, secção 3.11). Este procedimento permitiu a solubilização do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$. A remoção do detergente foi feita por diálise contra um tampão de 20mM de Tris-HCl pH 8 e 100mM de NaCl. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. O grau de pureza obtido na purificação foi analisado em gel de SDS-PAGE (Figura 37).

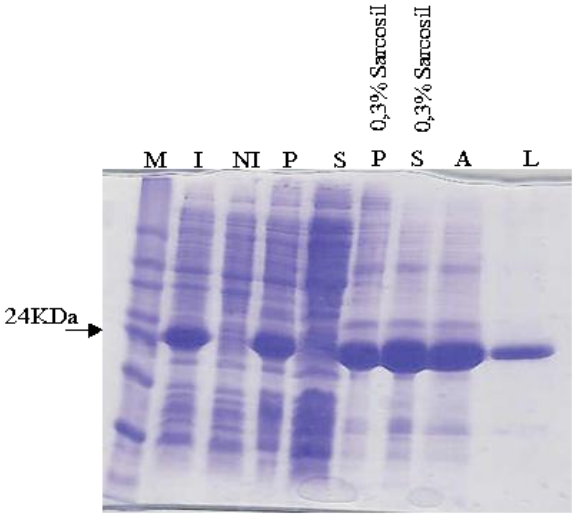


Figura 37: Gel de SDS-PAGE 15% da purificação da proteína Xac2191. M) marcador de peso molecular, I) induzido, NI) não induzido, P) precipitado de corpúsculo de inclusão após a lise celular, S) sobrenadante após a lise, P) precipitado após o tratamento com 0,3% N-lauroil-sarcosil, S) sobrenadante após o tratamento com 0,3% N-lauroil-sarcosil. A) Amostra que contém $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ na forma solúvel , utilizada para a purificação na coluna de Níquel L) eluído após lavagem com tampão A (20mM de Tris-HCl pH 8 e 100mM de NaCl) anteriormente à aplicação do gradiente de concentração de imidazol.

A região N-terminal do fator anti-σ Xac2192 ($Xac2192_{1-107}$) também foi encontrada nos corpúsculos de inclusão e para solubilizá-la, foi utilizado solução 8M de uréia. A purificação foi feita em cromatografia de troca catiônica (SP-sepharose) seguida por uma cromatografia de gel filtração (Superdex-75), ambas na presença de 8M de uréia (Figura 38). O reenovelamento foi feito através de diálises em tampão (50mM Tris-HCl pH 8, 10% glicerol e 2-mercaptoetanol) com concentrações decrescentes de uréia (6M, 3M e 0M).

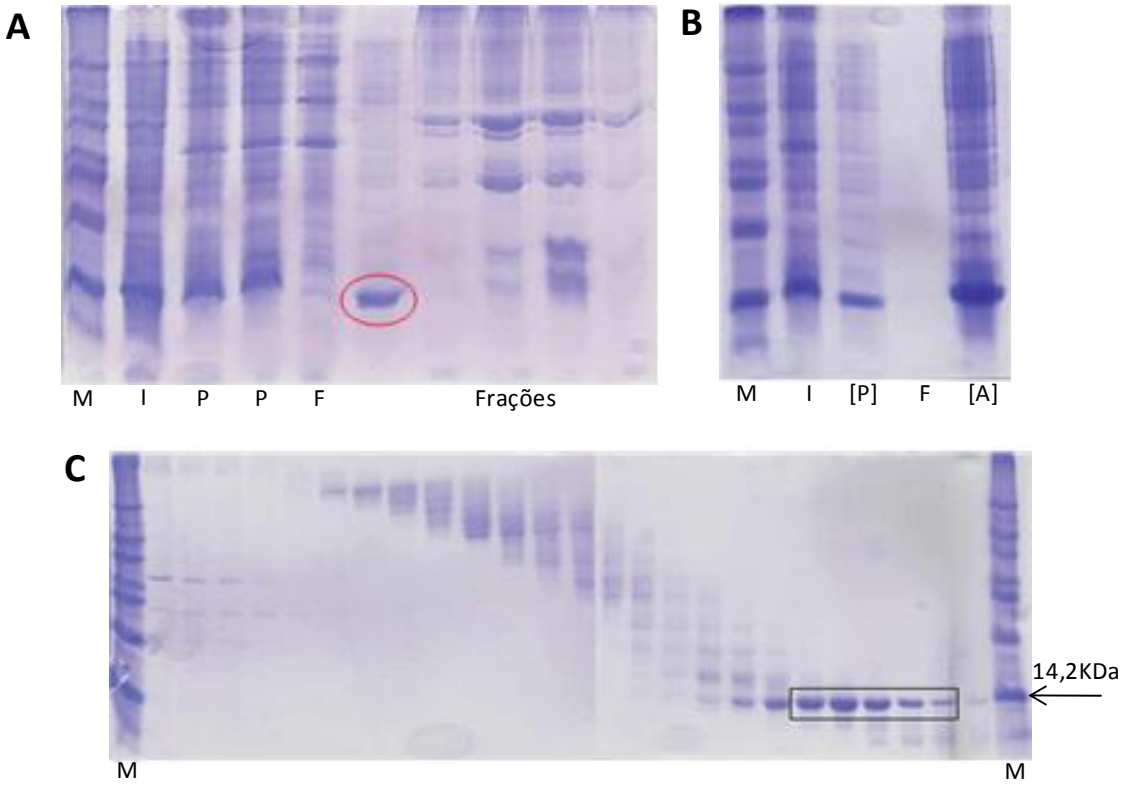


Figura 38: Gel de SDS-PAGE 18%. Representação das etapas de purificação da região N-terminal de $Xac2192_{1-107}$. (A) Procedimento de purificação de $Xac2192_{1-107}$ em cromatografia de troca catiônica (SP-sepharose). M) marcador de peso molecular, I) indução, P) corpúsculo de inclusão após a lise, F) Eluído durante a aplicação da amostra na coluna. Círculo em vermelho representa a amostra contendo $Xac2192_{1-107}$ e impurezas utilizada para aplicação na coluna de Níquel e Frações de eluições utilizando um gradiente de concentração de NaCl (0 a 500mM). (B) Concentração do eluído durante lavagem da coluna contendo $Xac2192_{1-107}$ em 4mL. M) marcador de peso molecular, I) indução, [P] eluído antes da concentração, F eluído durante a concentração e [A] Amostra concentrada utilizada para na cromatografia de gel filtração. (C) Procedimento de purificação de $Xac2192_{1-107}$ em cromatografia de gel filtração.

A sequência que codifica o $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ (22 KDa) foi clonada no vetor pET28a e as expressões em larga escala foram feitas na cepa de *E.coli* BL21(DE3) RP (Figura 39). A sequência que codifica a região N-terminal do fator anti-$\sigma_{Xac4130}$ ($Xac4130_{1-117}$) foi clonada no vetor pET28a os testes de mini-indução foram feitos nas cepas BL21D3, BL21(D3)PlysS, BL21(D3)RP, BL21(D3)Ril e BL21(D3)Star utilizando 0,4 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactoperanocidio) durante 4 e 16 horas a 30ºC e a 37ºC, respectivamente. Infelizmente, a expressão de $Xac4130_{1-117}$ não foi detectada em nenhuma destas condições (Figura 40).

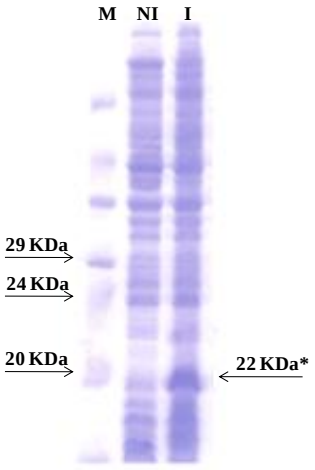


Figura 39: Gel de SDS-PAGE 15%. Representação da indução em larga escala do fator $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ na cepa BL21(D3)RP. M) marcador de peso molecular, NI) Não induzido e I) induzido. O símbolo (*) indica o padrão de migração diferente do $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$, ou seja, a proteína de 22KDa migra no gel abaixo 20KDa.

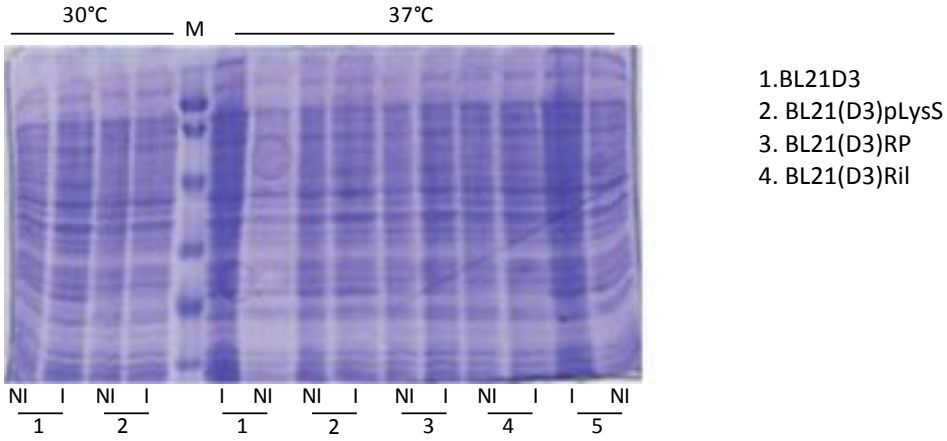


Figura 40: Gel de SDS-PAGE 18% que apresenta o resultado dos testes de mini indução de $Xac4130_{1-117}$ realizados em diferentes cepas de expressão e em diferentes temperaturas (30ºC e 37ºC). NI) não induzido e I) induzido.

Após expressão em *E.coli*, o fator $\sigma^{ECF}{}_{Xac4129}$ foi encontrado nos corpúsculos de inclusão. A proteína foi solubilizada em tampão contendo 8M de uréia. A purificação foi feita através da cromatografia de afinidade em uma coluna de níquel e a qualidade da purificação foi analisada em gel de SDS-PAGE (Figura 41). Mesmo após muitas tentativas de reenovelamento em diferentes tampões, não foi possível obter a protéina na forma solúvel. Devido às dificuldades em expressar a região N-terminal do fator anti-$\sigma_{Xac4130}$ e obter $\sigma^{ECF}{}_{Xac4129}$ na forma solúvel, não foi possível realizar ensaios de interações "in vitro" desse par de proteína.

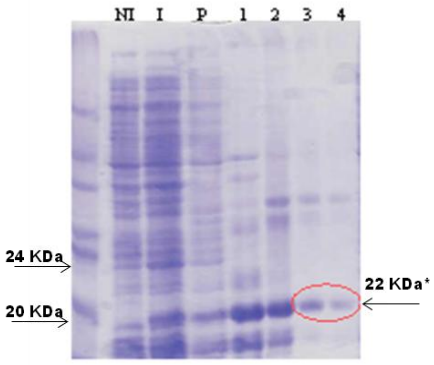


Figura 41: Gel de SDS–PAGE 15%. Purificação de Xac4129 em coluna de níquel. NI) não induzido, I) induzido, P) precipitado de corpúsculo de inclusão após a lise. Os números 1, 2, 3, e 4 representam as frações onde a proteína foi eluída utilizando gradiente de concentração de imidazol (20mM a 500mM).

A interação entre o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e a região N-terminal do fator anti-$\sigma_{Xac2192}$ foram analisadas por " Far-Western blot" ou "Overlay"(ver secção 3.12). A região N-terminal de $Xac2192_{1-107}$ foi submetida a eletroforese SDS-PAGE (18%) e transferida para uma membrana de nitrocelulose. Uma membrana contendo a proteína $Xac2192_{1-107}$ foi incubada com a proteína Xac2191(com cauda de histidina) em solução. A interação entre as duas proteínas foi detectada com anticorpo anti-His, demonstrando a interação positiva entre as proteínas (Figura 42). Como controle negativo, a membrana contendo $Xac2192_{1-107}$ foi incubada com o anticorpo anti-His e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase e como controle positivo, a membrana contendo Xac2191 (com cauda de histidina) foi incubada com os anticorpos anti-His e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, comprovando a detecção de Xac2191 pelos anticorpos (Figura 42).

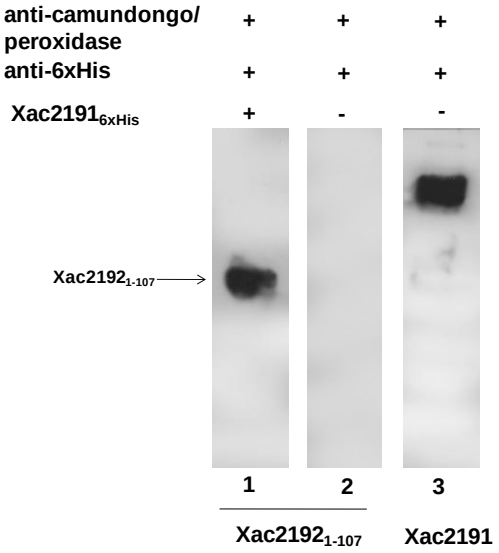


Figura 42: *"Far-Western blot"* ou *"overlay"* das proteínas $Xac2191_{6xHis}$-$Xac2192_{1-107}$. As proteínas $Xac2191_{6xHis}$ e $Xac2192_{1-107}$ foram submetidas a eletroforese (Gel de SDS-PAGE 18%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Em (1) $Xac2192_{1-107}$ foi imobilizada e incubada com a proteína $Xac2191_{6xHis}$ em solução, em (2) $Xac2192_{1-107}$ foi imobilizada e incubada com os anticorpos anti-6xHis e anti-IgG camundongo conjugado com peroxidase (controle negativo) e em (3) $Xac2191_{6xHis}$ pura foi imobilizada e incubada com os anticorpos anti-6xHis e anti-IgG camundongo conjugado com peroxidase (controle positivo).

4.6.6 Investigação da relação dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ com a cascata de ativação do sistema TTSS em *Xac*

Os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ são homólogos ao PrhI e os fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ são homólogos ao PrhR de *Ralstonia solanacearum*. Baseado nessas informações, nós realizamos ensaios para investigar se esses fatores atuam na via de sinalização responsável pela ativação do conjunto de genes *hrp* ("hypersensitive response and pathogenicity") de *Xac*.

4.6.6.1 Ensaios de EMSA realizados com o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e as regiões promotoras dos possíveis homólogos a *prhJ*

Em *Ralstonia solanacearum*, a cascata de transdução de sinal PrhA-PrhR-PrhI está integrada com os reguladores PrhJ, HrpG e HrpB (vide secção 1.7 na Introdução) (Brito *et al*, 2002). O fator σ PrhI é um ativador do gene *prhJ*, ou seja, o fator σ PrhI, juntamente com o núcleo da RNA polimerase, reconhece a região promotora do gene *prhJ* e ativa a sua transcrição. PrhJ é um fator de transcrição da família LuxR que controla a expressão do gene *hrpG*, enquanto que a proteína HrpG ativa a expressão do gene *hrpB*, requerido para induzir a expressão dos genes *hrp* na presença de células vegetais (Brito *et al*, 2002). Em *Xac*, foram encontradas nove proteínas com domínio LuxR que são potenciais homólogos a PrhJ de *Rasltonia solanacearum* (Tabela 11). Uma hipótese para ser testada é se uma dessas proteínas de *Xac* pode desempenhar uma função similar a de PrhJ de *R.solanacearum*.

Tabela 11: Proteínas de Xac homólogas a PrhJ de *R. Solanacearum*. Na coluna à esquerda estão representadas as proteínas em *Xac*. Em parênteses estão indicados os números de resíduos de cada proteína e o número de resíduos do domínio regulador da família LuxR. Na coluna à direita estão representadas as arquiteturas dessas proteínas em comparação com a proteína PrhJ em *R. Solanacearum:*RR: domínio regulador de resposta, LuxR: domínio regulador da família LuxR e TPR: repetição tetratricopeptídeo.

Homólogos de PrhJ em *Xac* (resíduos totais/domínio LuxR)	**Domínios** (Arquitetura de PrhJ de *R. solanacearum*, 175 aa) (domínioLuxR = residuos 105-162)
	LuxR
Xac1229 (214 aa/ resíduos 147-212)	RR LuxR
Xac1970 (210 aa/ residuos 141-206)	RR LuxR
Xac4180 (222 aa/ residuos 143-208)	RR LuxR
Xac3480 (212 aa/ residuos 142-207)	RR LuxR
Xac3421 (923 aa/ residuos 846-907)	TPR TPR LuxR
Xac0898 (235 aa/ residuos 171-228)	LuxR
Xac2168 (213 aa/ residuos 146-207)	RR LuxR
Xac3993 (200 aa/ residuos 133-198)	RR LuxR
Xac0136 (210aa/ residuos 143-208)	RR LuxR

Se a hipótese estiver correta, espera-se que o promotor de um ou mais dos homólogos a PrhJ sejam reconhecidos pela RNA polimerase contendo um dos fatores σ mais similares a PrhI. Uma das estratégias utilizadas na tentativa de identificar essas possíveis interações foi realizar ensaios de mobilidade eletroforética (EMSA). Para isso, a região de 300 pb a jusante do códon de iniciação da tradução para cada uma das proteínas da Tabela 11 foi amplificada por PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos indicados na Tabela 6 (Materiais e Métodos) a partir de DNA genômico de *Xac* (Figura 43).

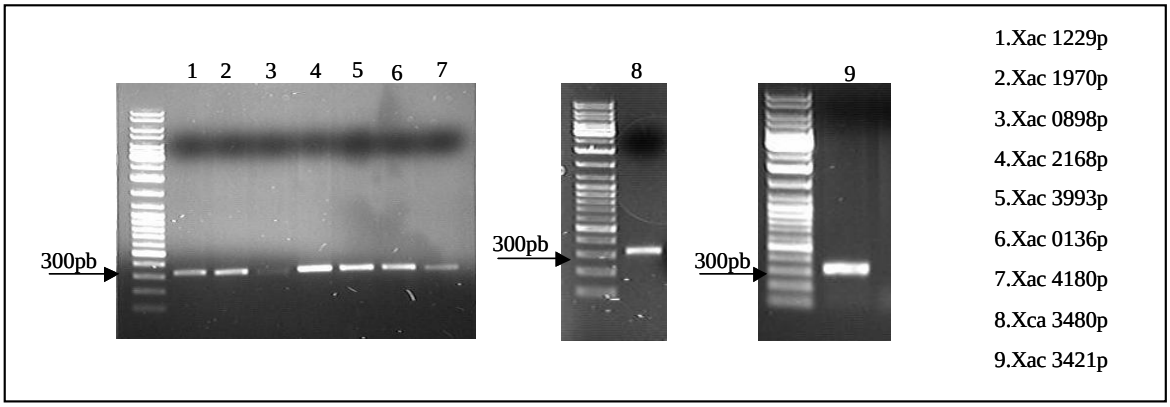
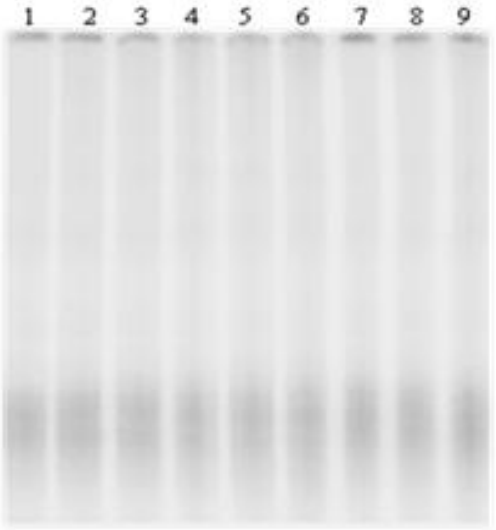


Figura 43: Produtos de PCR gerados a partir do DNA genômico de *Xac*, utilizando par de oligonucleotídeos que amplifica a região de 300 pb a jusante do códon de iniciação da tradução para cada uma das proteínas homólogas a PrhJ. Esses fragmentos foram marcados com [γ^{32}P]-ATP e utilizados nos ensaios de EMSA.

Para os ensaios de mobilidade eletroforética, o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ fusionado a uma cauda de histidina foi purificado utilizando cromatografia de afinidade a níquel (Figura 37) e combinado com a apoenzima da RNA polimerase de *E.coli*, conforme descrito na secção 3.17 de materiais e métodos. As regiões promotoras dos possíveis homólogos a PrhJ foram marcadas com [α^{32}P]-ATP utilizando o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E.coli*. Os ensaios de interação foram realizados diversas vezes, no entanto, não foi possível detectar nenhuma ligação entre o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e as regiões promotoras testadas (Figura 44).



1- promotor Xac1970
2- promotor Xac1229
3- promotor Xac0898
4- promotor Xac3993
5- promotor Xac2168
6- promotor Xac4180
7- promotor Xac0136
8- promotor Xac3480
9- promotor Xac3421

Figura 44: Ensaios de EMSA utilizando as prováveis regiões promotoras dos homólogos a PrhJ de *R. solanacearum*. A RNA polimerase foi reconstituída com a apoenzima de *E.coli* e o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$. Para cada reação de ligação foi utilizado 1µM do $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$, 0,6 µL da apoenzima da RNA polimerase de *E.coli* e 0,2 µL do DNA marcado. As reações de ligações foram separadas por eletroforese em gel não desnaturante com 5% de acrilamida.

Mediante aos resultados negativos observados, duas hipóteses foram levantadas: 1) O fator sigma Xac2191 não está relacionado com a ativação da transcrição de homólogos de *PrhJ* ou 2) A proteína purificada não possui a conformação nativa apropriada, visto que a mesma se encontrou insolúvel no primeiro passo de indução e teve que ser reenovelada com adição de N-Lauroil-Sarcosine (Figura 37).

O experimento de mobilidade eletroforética com o fator σ Xac4129 não pôde ser realizado devido às dificuldade em obter a proteína na forma solúvel (Secção 4.6.5.4 e Figura 41).

4.6.6.2 Produção dos nocautes não polares dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$, $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$

Foram produzidos nocautes apolares dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$, além do duplo nocaute para os dois fatores sigmas. As deleções dos genes foram confirmadas por PCR de colônia e analisadas em gel de agarose (Figura 45).

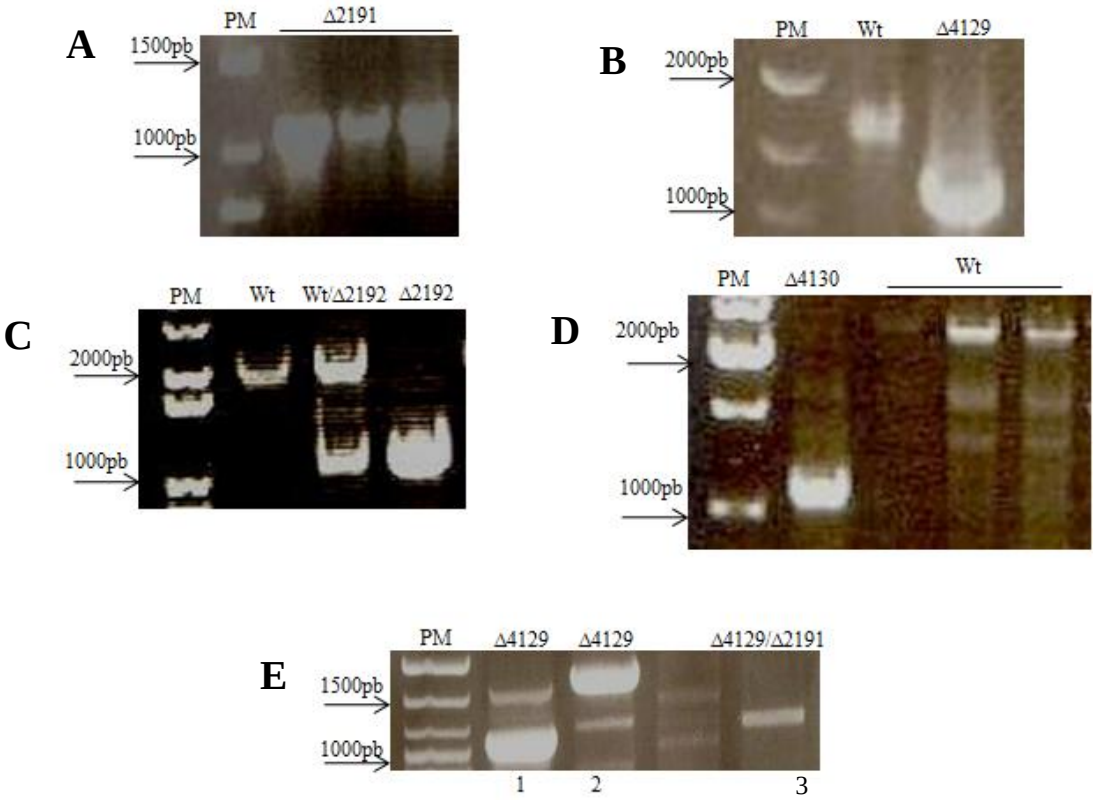


Figura 45: Fotos do gel de agarose das reações de PCR de colônia para confirmação dos nocautes dos genes de interesse. A) Produtos de PCR utilizando um par de oligonucleotídeos que gera um fragmento de 1020 pb para a cepa mutante do fator σ Xac2191. B) Produtos de PCR empregando um par de oligonucleotídeos que gera um fragmento de 1500 pb para a cepa tipo selvagem e de 1000 pb para a cepa mutante do fator σ Xac4129. C) Produtos de PCR empregando par de oligonucleotídeos que gera fragmento de 2000pb para a cepa tipo selvagem e de 1000pb para a cepa mutante do fator anti-σ Xac2192. D) Produtos de PCR empregando par de oligonucleotídeos que gera um fragmento de 2000 pb para a cepa mutante e de 1020pb para a cepa mutante do fator anti-σ Xac4130 e E) Produtos de PCR empregando um par de oligonucleotídeos que amplifica um fragmento de 1020pb, referente ao gene Xac 4129, ou seja controle positivo para a cepa mutante de Xac4129 (coluna 1) e produtos de PCR empregando par de oligonucleotídeo que amplifica um fragmento de aproximadamente 1500pb para o gene de Xac2191 na cepa mutante de Xac4129 (coluna 2). A confirmação da cepa mutante para os dois fatores σ Xac4129 e Xac2191 foi feita por PCR utilizando um par de oligonucleotídeos que amplifica um fragmento de 1100 pb referente ao gene Xac2191(coluna 3).

4.6.6.3 Ensaios de patogenicidade realizados em folhas de laranja pêra

Ensaios de patogenicidade foram realizados para avaliar as participações dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ no processo de infecção e na capacidade de desenvolver o cancro cítrico. As cepas selvagens (Wt) e as cepas mutantes ΔXac2191, ΔXac2192, ΔXac4129, ΔXac4130 e ΔXac4129/ΔXac 2191 foram inoculadas em folhas de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Após 15 dias, as linhagens mutantes apresentaram o mesmo fenótipo observado para a cepa selvagem (Figura 46). Em comparação, as cepas mutantes de *prhI* e *prh*R em *R.solanacearum* apresentaram os sintomas da doença significativamente atenuados (Brito *et al*., 2002)

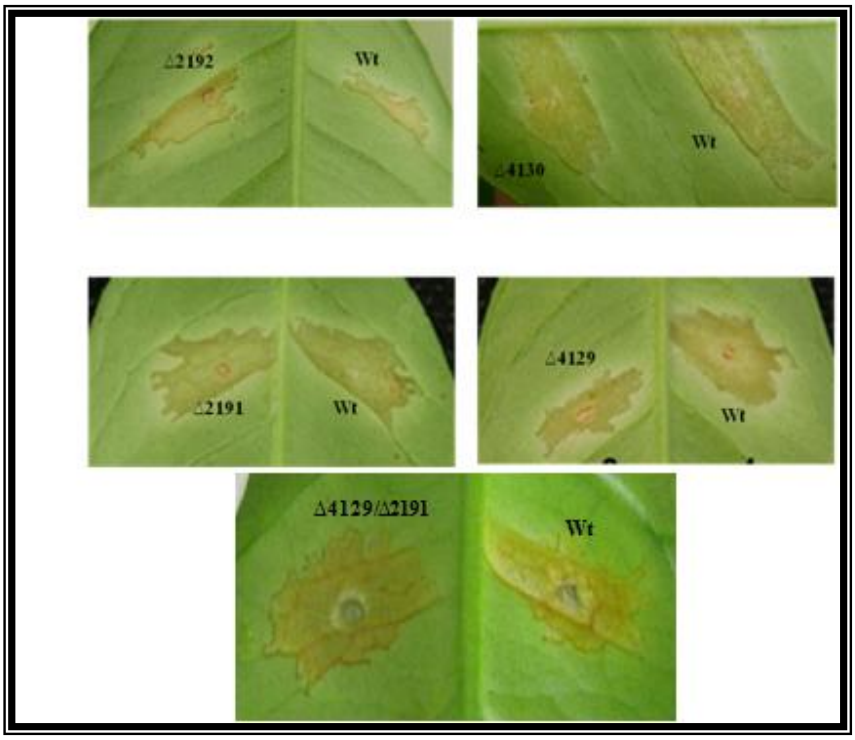


Figura 46: Teste de patogenicidade das cepas mutantes ΔXac2192, ΔXac4130, ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/ΔXac2191 em folhas de laranja pêra. A cepa *Xac* selvagem (Wt) foi utilizada como controle negativo. As fotos foram tiradas após 15 dias das inoculações.

4.6.6.4 Análise das expressões dos genes *hrpG, hrpX, hrcU* e dos homólogos a *prhJ (Xac0136, Xac0898, Xac1229, Xac1970, Xac2168, Xac3421, Xac3480, Xac3993* e *Xac4180)* por qRT-PCR

Outra estratégia foi adotada para investigar a hipótese de que existe uma via em Xac homóloga à via PrhA-PrhR-PrhI-PrhJ de *R. solanacearum*. Para isso, experimentos de PCR em tempo real foram realizados com as cepas tipo selvagem (Wt), ΔXac2191, ΔXac4129, XacΔ4129/Δ2191, ΔXac2192 e ΔXac4130. As análises das expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* foram analisadas com objetivo de verificar a indução do sistema de TTSS.

Dados da literatura mostram que em *Xanthomonas* a expressão dos genes *hrp* (*"Hypersensitive response and pathogenicity"*) é induzida em meio XVM2 (aumento de 4 vezes) (Schulte & Bonas, 1992; Wengelnik & Bonas, 1996). Dessa forma, o primeiro teste realizado foi para certificar que o meio XVM2 utilizado no crescimento das cepas é de fato capaz de induzir o TTSS em *Xac*. Para isso, as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU*, foram analisadas por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR), comparando-se os níveis de expressões desses genes com as cepas selvagens crescidas tanto em meio LB quanto em meio XVM2. HrpX controla a ativação dos genes *hrp*, responsáveis pela formação de toda a maquinaria do TTSS, e HrcU é uma subunidade conservada em todos os TTSSs conhecidos. As análises das expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* em meio XVM2 mostraram um aumento na expressão de 10 vezes para *hrpX* e de 17 vezes para *hrcU*, no entanto, a expressão do gene *hrpG* não foi alterada (Figura 47).

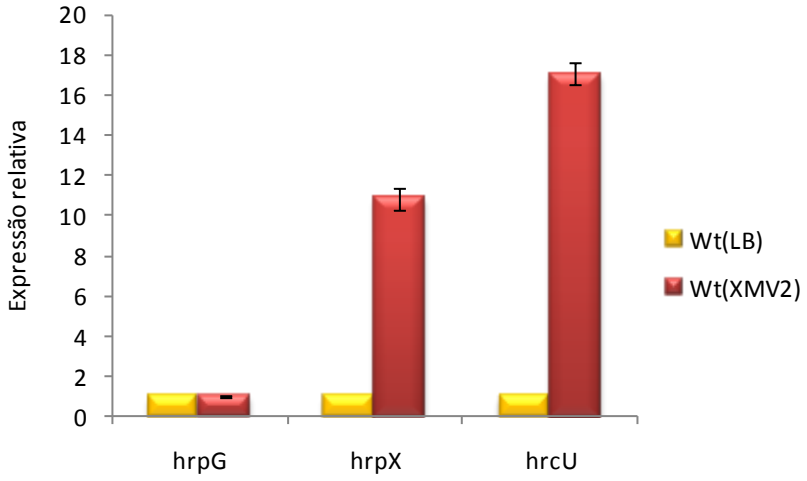


Figura 47: Análise por qRT-PCR comparando a expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* na cepa selvagem (Wt) de *Xac*. Os RNAs foram extraídos da cepa Wt crescida em meio LB e XVM2. O PCR em tempo real foi feito utilizando oligonúcleotídeos específicos, como descrito em materiais e métodos (Tabela 7). Os níveis das expressões relativas foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o gene XAC4291 (16S do RNA ribossomal) como normalizador. Os dados apresentados correspondem à média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.6.6.5 Efeito da mutação dos genes *Xac2192* e *Xac4130* nas expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU*

A cascata de transdução de sinal que ativa a transcrição dos genes *hrp* em *R. solanacearum* está integrada com o fator anti-σ PrhR e com o fator σ PrhI. O fator anti-σ controla o fator σ por interação proteína-proteína, ou seja, na presença do fator anti-σ, o fator σ está inibido. Experimentos de qRT-PCR foram efetuados para análise das expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* nas cepas selvagens, ΔXac2192 e ΔXac4130 crescidas em meio rico. A nossa hipótese para ser testada era que na ausência do fator anti-σ relacionado com a ativação TTSS, as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* estariam induzidas em meio LB, uma vez que o fator σ não estaria sob seu controle inibitório. Os resultados de qRT-PCR mostraram que as mutações dos genes Xac2192 e Xac4130 não alteraram as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* (Figura 48).

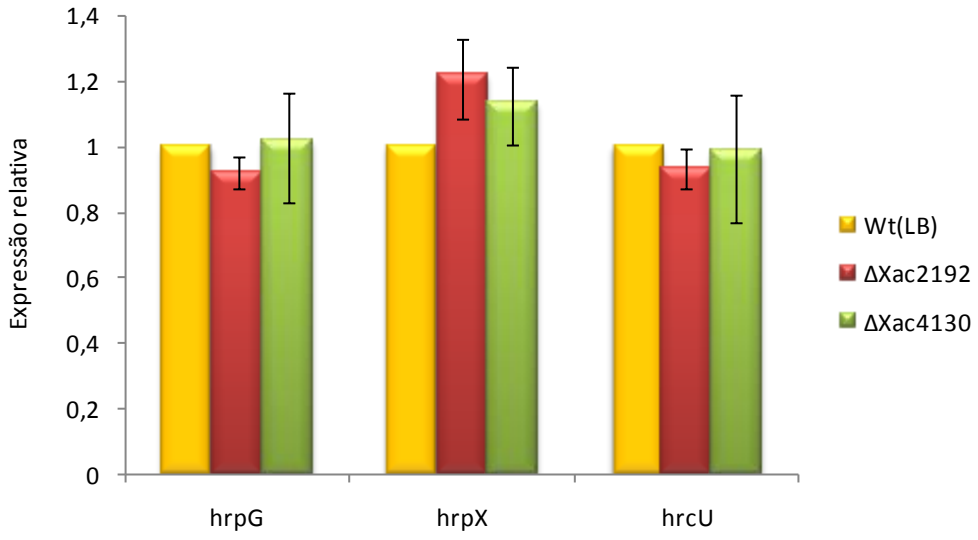


Figura 48: Análise por qRT-PCR comparando as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* na cepa selvagem e nas cepas mutantes ΔXac2192 e ΔXac4130. Os RNAs foram extraídos das cepas Wt e mutantes crescidas em meio LB . O PCR quantitativo em tempo real foi feito utilizando oligonúcleotídeos específicos (Tabela 7). As expressões relativas foram calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o gene XAC4291 (16S) como normalizador. Os dados apresentados correspondem à média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.6.6.6 Efeito das mutações dos genes *Xac2191* e *Xac4129* nas expressões dos genes *hrpG, hrpX , hrcU* e nos genes homólogos a *prhJ*

Para avaliar a participação dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ na via de ativação do sistema de secreção tipo III (TTSS), foram realizados experimentos de qRT-PCR. O objetivo do experimento foi de analisar os níveis de expressões dos genes *hrpG, hrpX e hrcU* nas cepas de *Xac* selvagem, ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/ΔXac2191 quando crescidas em meio XVM2. Os resultados apresentados na Figura 49 demonstram que as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* não sofreram variações significativas nas cepas mutantes para os dois fatores σ testados.

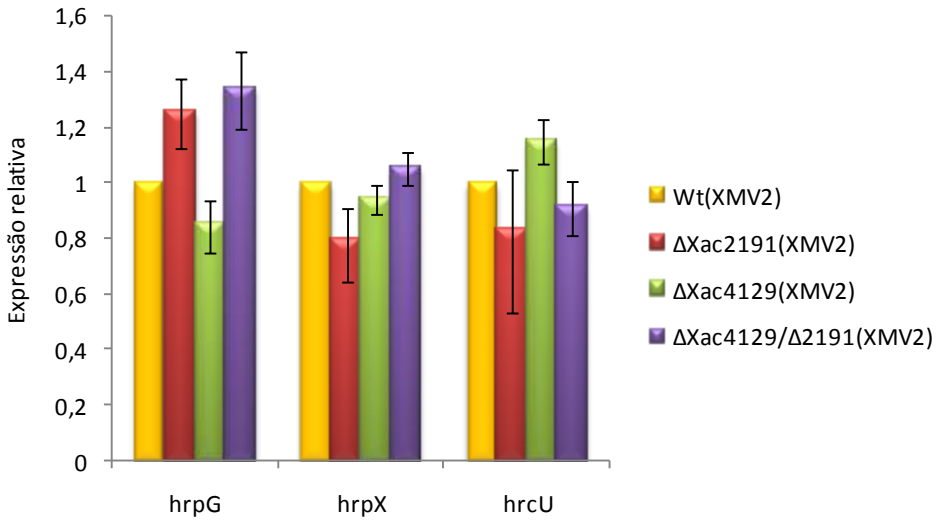


Figura 49: Análise por qRT-PCR comparando a expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* nas cepas selvagem e nas cepas mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e no duplo mutante ΔXac4129/ΔXac2191.Os RNAs foram extraídos da cepa Wt e mutantes crescidas em meio XVM2 . O PCR em tempo real foi feito utilizando oligonúcleotídeos específicos (Tabela 7). As expressões relativas foram calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o gene XAC4291 (16S) como normalizador. Os dados apresentados correspondem à média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

Na via de ativação do TTSS em *Ralstonia solanacearum*, o fator σ PrhI ativa a transcrição de *prhJ*, que codifica um regulador transcricional da família LuxR. Se essa via for similar para *Xac*, uma maneira de identificar o verdadeiro ortólogo de PrhJ (Tabela 11) seria através da análise das expressões desses genes em relação as cepas mutantes dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$. Dessa forma, seria esperado uma diminuição da expressão do verdadeiro homólogo de *prhJ*. Para testar essa hipótese, foram realizados experimentos de qRT-PCR com a finalidade de analisar os níveis de expressões dos genes homólogos a *prhJ* (*Xac0136, Xac0898, Xac1229, Xac1970, Xac2168, Xac3421, Xac3480, Xac3993* e *Xac4180*) nas cepas selvagem e mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191 crescidas em meio XVM2. Os resultados mostraram que as expressões dos homólogos a *prhJ* não tiveram grandes variações nas cepas mutantes dos fatores σ, permitindo concluir que os fatores

$\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ não controlam as expressões dos homólogos de *prhJ* contendo domínios LuxR (Figura 50).

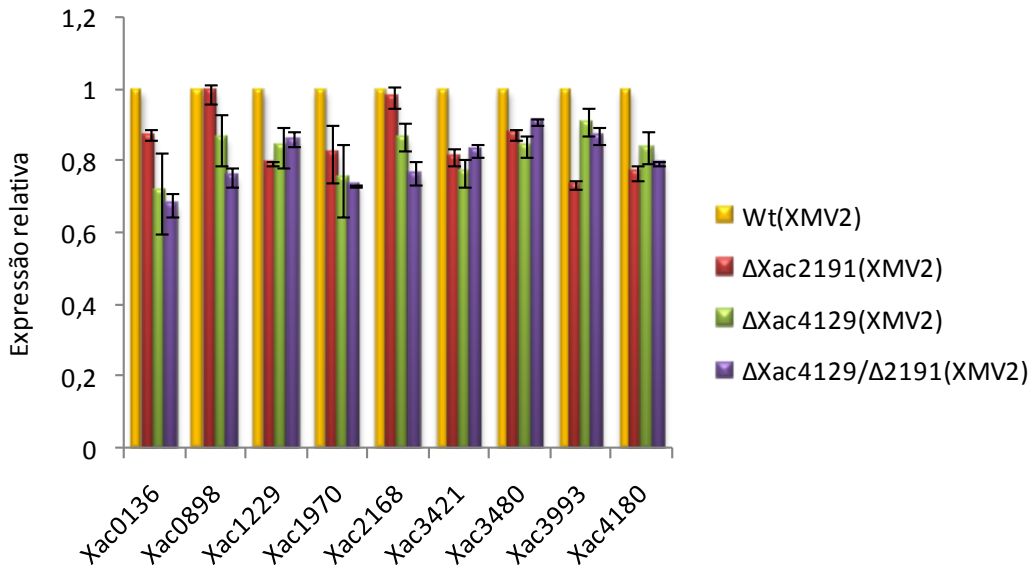


Figura 50: Análise por qRT-PCR comparando as expressões dos genes homólogos a *prhJ* (Xac0136, Xac0898, Xac1229, Xac1970, Xac2168, Xac3421,Xac3480, Xac3993 e Xac4180) nas cepas selvagem e mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191. Os RNAs foram extraídos da cepa Wt e mutantes crescidas em meio XVM2. O PCR em tempo real foi feito utilizando oligonúcleotídeos específicos (Tabela 7). As expressões relativas foram calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o gene XAC4291 (16S) como normalizador. Os dados apresentados correspondem à média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.7 Efeito da mutação do gene *hrpG* na patogenicidade em *Xac*

O fator de transcrição HrpG ativa a transcrição do gene *hrpX*. O produto de *hrpX*, por sua vez, ativa a transcrição de todos os outros operons do locus *hrp* em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Wengelnik et al., 1996). Portanto, HrpG é o principal regulador de todo o locus *hrp*. Em *Xac*, esta proteína possui 263 aminoácidos e contém um domínio N-terminal do tipo regulador de resposta (RR) do sistema de dois componentes (Varughese, 2002).

Para testar a relação do gene *hrpG* de *Xac* na ativação do sistema de secreção do tipo III, o nocaute apolar do gene foi produzido (em estreita parceria com a doutoranda Paola

Alejandra Cappelletti). Os ensaios de patogenicidade realizados para avaliar a capacidade do mutante de desenvolver o cancro cítrico mostraram que a cepa Δ*hrpG* não foi capaz de desenvolver a doença no hospedeiro (Figura 51). Estes resultados demonstraram que HrpG de *Xac* deve controlar a via de ativação do genes *hrp* de forma direta, similarmente ao que tem sido observado em *R.solanacearum* (Brito *et al*, 2002) e *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* (Wengelnik *et al.*, 1996).

Figura 51: Teste de patogenicidade realizado com a cepa mutante do gene *hrpG* e com a cepa complementada com o gene *hrpG* no vetor pUFRO47 (ΔhrpG +hrpG) em folhas de laranja pêra. Fotos retiradas com 15 dias após as inoculações.

Para confirmar o fenótipo observado para o nocaute Δ*hrpG*, a complementação do gene *hrpG* foi feita utilizando-se o vetor pUFRO47 (Figura 52) (De Feyter *et. al.*, 1993). A estratégia adotada para a complementação do gene *hrpG* foi de clonar um fragmento contendo 348pb a jusante do códon de iniciação do gene *hrpG* e toda a sequência codificadora de *Hrp* (vide Materiais e Métodos, secção 3.14). Os resultados mostraram que não houve reversão do fenótipo observado na folhas de laranja pêra (Figura 51), provavelmente porque a região de 348pb selecionada como região promotora do gene não corresponde a toda a seqüência necessária para a ativação do gene.

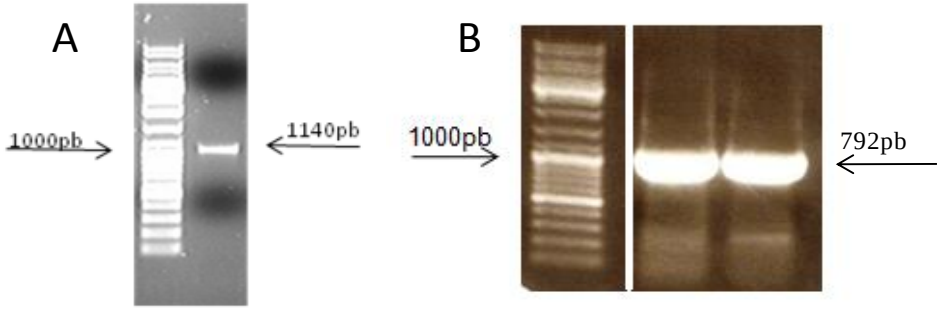


Figura 52: Gel de agarose 1%. A) Amplificação do gene *hrpG* (792 pb) e da seqüência de 348 pb a jusante do códon de iniciação do mesmo (total = 1140 pb). B) PCR de colônia para confimar a clonagem na vetor pUFRO47 utilizando par de oligonucleotídeos que amplifica o gene *hrpG*.

Outra evidência de controle da transcrição dos genes *hrpX* e do locus *hrp* por HrpG foi observada em ensaios de PCR em tempo real realizados com as cepas tipo selvagem e mutante Δ*hrpG* crescidas em meio XVM2. A expressão do gene *hrpX* não foi detectada nos ensaios com o mutante ΔhrpG, confirmando que a expressão do gene *hrpX* depende de HrpG. Além disso, a expressão de *hrcU* não foi detectada, consistente com a hipótese que a transcrição dos demais genes *hrp* depende de HrpX (Figura 53).

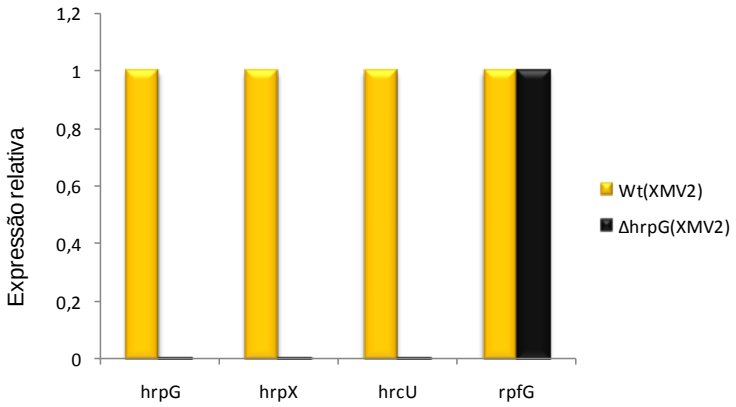


Figura 53: Análise por qRT-PCR comparando as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* nas cepas selvagem e na mutante ΔhrpG. Os RNAs foram extraídos da cepa Wt e mutante crescida em meio XVM2 e PCR em tempo real foi feito utilizando oligonúcleotídeos específicos (Tabela 7). As expressões do genes *hrpG, hrpX e hrcU* não foram detectadas.

4.8 Caracterizações das cepas mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/ΔXac2191 nas respostas a diferentes tipos de estresse

4.8.1 Crescimento na carência de ferro

O ferro é o quarto metal mais abundante na Terra, sendo encontrado no meio ambiente como componente insolúvel na forma de hidróxidos e também em sistemas biológicos, apresentando-se quelado por proteínas de alta afinidade (Weinberg, 1984). O ferro é essencial para a maioria dos organismos, pois sua forma iônica é chave para os citocromos, centros ferro-enxofre e para outros componentes metabólicos. As bactérias desenvolveram mecanismo de controle para captar ferro do meio e também de proteção contra efeitos tóxicos provocados pela geração de espécies reativas de oxigênio estimuladas pelo ferro (Touati, 2000). Um mecanismo de controle ocorre através do próprio ferro, ou seja, a elevada concentração desse metal ocasiona uma inibição da expressão dos genes relacionados com a absorção do mesmo. Esse controle ocorre em conjunto com a proteína Fur que age como um repressor da transcrição. Outro mecanismo de controle ocorre em situações ambientais de carência de ferro (Frost & Rosenberg, 1973; Waggeg & Braun, 1981).

Em *E.coli* o transporte de ferro para o citoplasma é sinalizado pela baixa concentração de citrato de ferro, através do sistema dicitrato férrico (FecABCDE), que por sua vez é reprimido pela proteína Fur em condições de alta concentração de ferro (Braun, 1997). O sistema de transporte de citrato de ferro é formado por uma proteína sensora e transportadora de membrana externa chamada FecA, pela proteína periplasmática FecB, proteínas de membrana citoplasmática FecCD e pela proteína de ligação a ATP FecE (Braun & Mahren, 2005). O Fe^{3+} é transportado para o periplasma por FecA através da membrana citoplasmática na forma de complexo dicitrato de ferro. A ligação do dicitrato de ferro à proteína FecA induz um sinal que é transferido da membrana externa para a membrana citoplasmática e posteriormente para o citoplasma, através de FecR, uma proteína de transmembrana. Dessa

forma o fator σ FecI é ativado e ativa a transcrição dos genes *fecABCDE*, juntamente com o núcleo da RNA polimerase (Braun & Mahren, 2005). Mutações na região 2 do fator σ FecI impedem o reconhecimento do núcleo da RNA polimerase, afetando a expressão de *fecB*.

Os $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ possuem similaridade ao fator σ FecI de *E.coli* (Figura 31). Na tentativa de investigar uma relação desses fatores σ na captação de ferro, foram feitas curvas de crescimento em condições normais (meio LB) e também em condição de carência de ferro. As culturas de *Xac* selvagem e as mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191 foram crescidas em meio LB na presença e ausência de 50 µM de 2,2´dipiridil, um potente quelante de ferro durante a fase exponencial de crescimento. Na presença de 2,2´dipiridil, as cepas ΔXac2191 e ΔXac4129/Δ2191 apresentaram um crescimento mais lento quando comparadas com as cepas selvagem e ΔXac4129 (Figura 54). Em condição de carência de ferro, o tempo de duplicação das cepas mutantes ΔXac2191 e ΔXac4129/Δ2191 foram de 6 horas, tempo 50% maior que o tempo de duplicação das cepas selvagem e mutante ΔXac4129, de aproximadamente 4 horas. Dessa forma, pode-se sugerir que a mutação de Xac2191 deve afetar a ativação dos genes relacionados com a captação de ferro em condição de carência desse metal.

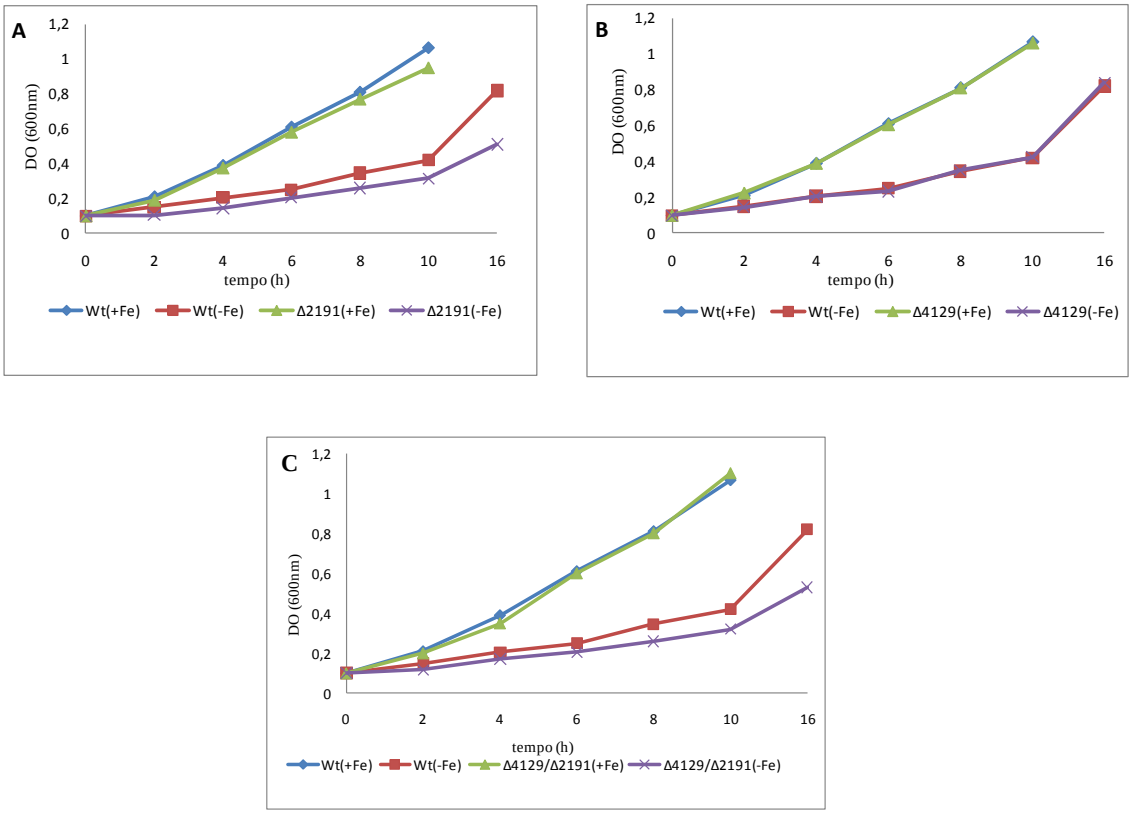


Figura 54: Curva de crescimento das cepas de Xac Wt, ΔXac2191(A), ΔXac4129(B) e ΔXac4129/ΔXac2191(C). As culturadas de *Xac* em fase estacionária foram diluídas para uma DO_{600nm} 0,1 e inoculadas em meio LB na ausência de 2,2´dipiridil (+Fe) e na presença de 50µM de 2,2´dipiridil (-Fe). A figura mostra a média de três experimentos independentes.

4.8.2 Investigação dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ na resposta ao choque térmico, ao estresse oxidativo e na presença de etanol

Para investigar uma possível relação dos $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ a diferentes tipos de estresse, as cepas mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/ΔXac2191 foram submetidas a estresses, como choque térmico a 45ºC, estresse oxidativo na presença de 2,5mM de H_2O_2 e também na presença de 1,5% de etanol. Para os estresses de choque térmico e oxidativo, as culturas de células em fase estacionária foram diluídas para uma DO_{600nm} de 0,1 e crescidas até atingirem a DO_{600nm} de 0,5 (fase exponencial). Para calcular a porcentagem de células viáveis, as alíquotas retiradas em diferentes tempos foram diluídas e plaqueadas em meio LB

(Figura 55). Na avaliação ao estresse provocado pela presença de 1,5% de etanol, as culturas saturadas foram diluídas para uma DO_{600nm} de 0,1 e o crescimento foi monitorado através da leitura da DO_{600nm} (Figura 56). Os resultados dos ensaios mostraram que as cepas ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191 apresentaram os mesmo perfis que a cepa selvagem em todas as condições de estresse testadas. Portanto, pode-se concluir que os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ não atuam na resposta aos estresses de choque térmico, oxidativo e de etanol.

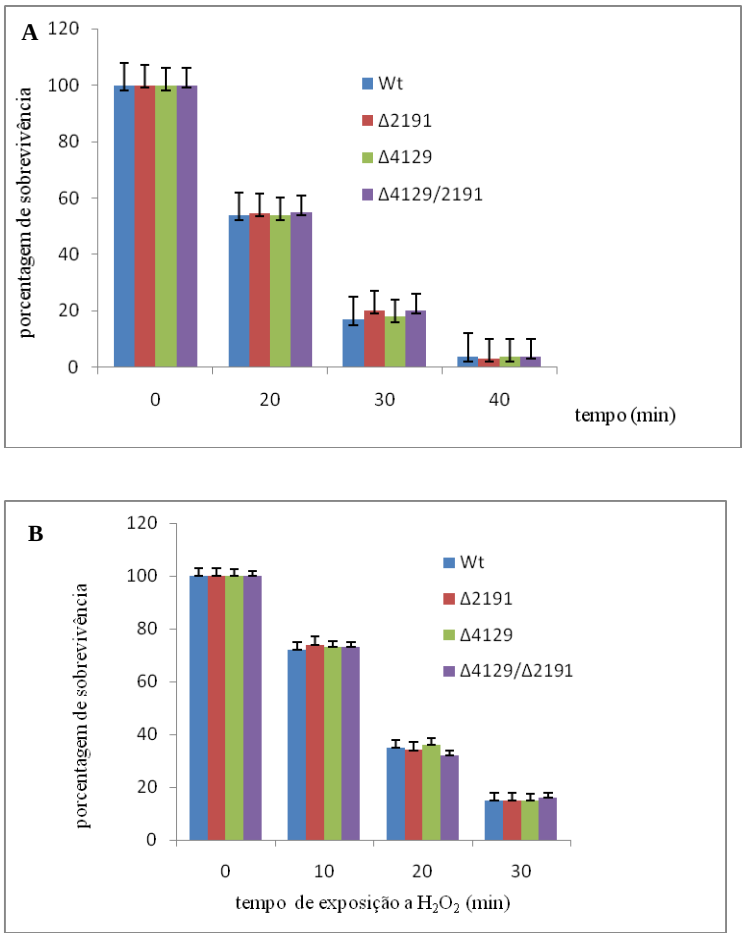


Figura 55: Análise dos mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191 em resposta ao choque térmico e ao estresse oxidativo. A) Sobrevivência das cepas Wt e mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191 submetidos ao choque térmico de 45ºC. B) Sobrevivência das cepas Wt e mutantes ΔXac2191, ΔXac4129 e ΔXac4129/Δ2191 submetidos ao estresse oxidativo (2,5 mM H_2O_2). Os resultados são expressos em porcentagem de sobreviventes em relação ao tempo zero (antes da exposição ao estresse). Cada experimento foi plaqueado em triplicata e foi feito com três replicas biológicas independentes. Os resultados mostrados representam a média e os desvio padrão.

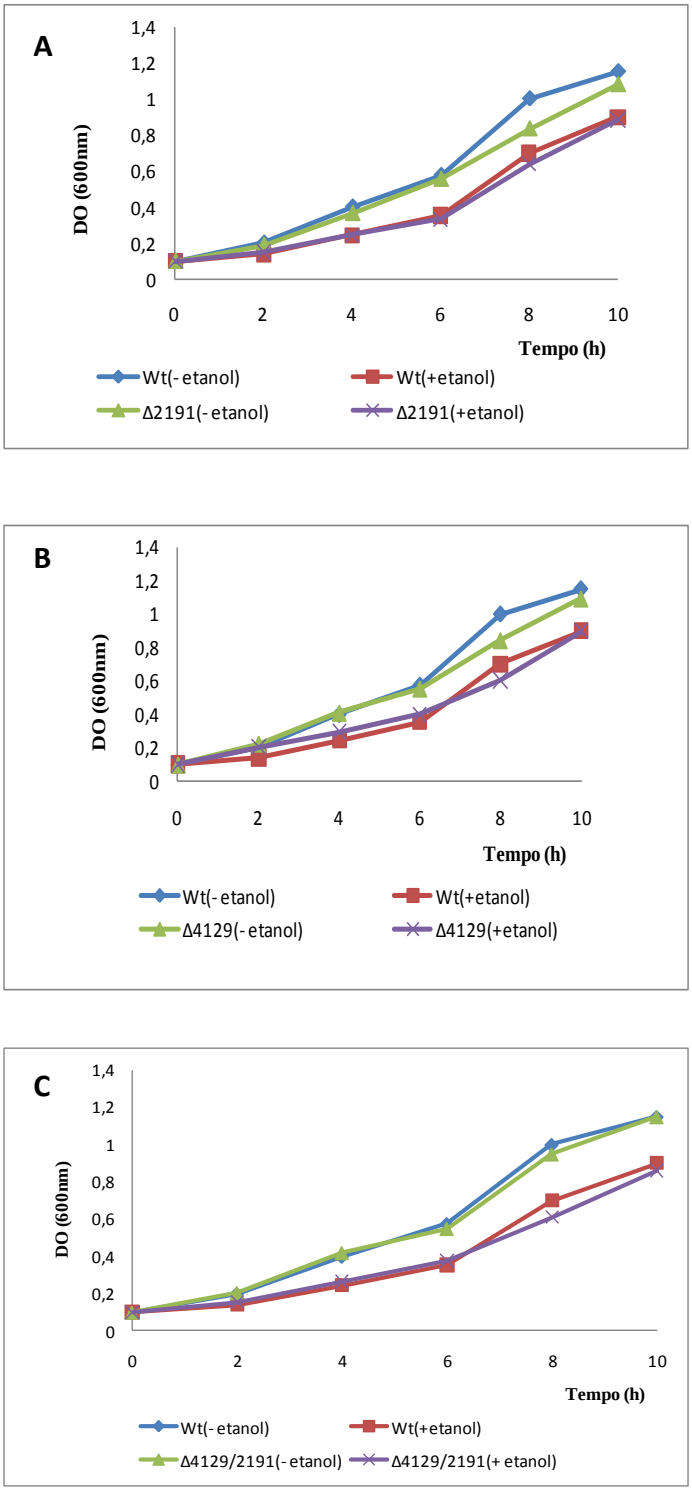


Figura 56: Curva de crescimento das cepas de *Xac* selvagem (Wt), ΔXac2191(A), ΔXac4129(B) e ΔXac4129/ΔXac2191(C). As culturadas de *Xac* em fase estacionária foram diluídas para uma DO600nm 0,1 e inoculadas em meio LB na ausência e na presença de 1,5% de etanol. A figura mostra a média de três experimentos independentes.

4.8.3 Investigação dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma^{ECF}_{Xac4130}$ no processo de motilidade bacteriana

Com a finalidade de investigar uma possível participação dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ no processo de motilidade foram realizados ensaios de motilidade em meio SB contendo 0,5% de ágar com as cepas selvagem (Wt), ΔXac2191, ΔXac2192, ΔXac4129, ΔXac4130 e o duplo mutante ΔXac4129/ΔXac2191. As cepas mutantes apresentaram o mesmo fenótipo do tipo selvagem. Portanto, os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e os fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ não são essenciais para a capacidade de Xac se espalhar em superfície úmidas (Figura 57).

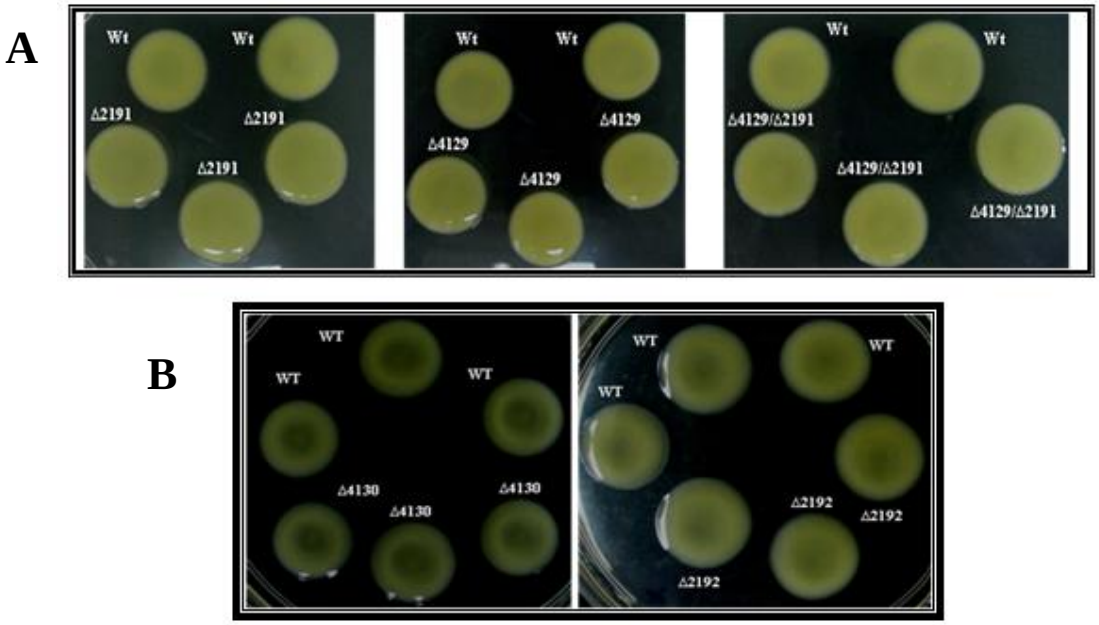


Figura 57: Ensaios de motilidade realizado meio SB contendo 0,5% de ágar. A) ensaios realizados com as cepas mutantes dos fatores σ Xac e com o duplo mutante dos fatores σ e em B) ensaios realizados com as cepas mutantes dos fatores anti- σ Xac4130 e Xac2192. Fotos retiradas com 2 dias de crescimento.

5 Discussão

5.1 Interações dos fatores σ^{ECF} com os fatores anti-σ^{ECF} cognatos

Os fatores σ^{ECF} são pequenas proteínas regulatórias bastante divergentes em relação à sequência da maioria dos outros fatores σ. As bactérias que apresentam um genoma mais complexo contêm vários fatores σ^{ECF}. Por exemplo, *B. subtilis* (7 σ^{ECF}), *Mycobacterium tuberculosis* (10 σ^{ECF}), *Caulobacter crescentus* (13 σ^{ECF}), *Pseudomonas aeruginosa* (19 σ^{ECF}) e *Coelicolor streptomyces* (50 σ^{ECF}) (Helmann, 2002). A função e o mecanismo de regulação desses σ^{ECF} muitas vezes são desconhecidos, mas de um modo geral, a maioria são co-transcritos com um regulador negativo, uma proteína de transmembrana com a função anti-σ, capaz de ligar e inibir o σ^{ECF}. O fator anti-σ funciona como um sensor (direto ou indireto) de moléculas de sinalização, permitindo a bactéria uma resposta adaptativa às mudanças ambientais específicas. Ao receber o estímuloambiental, o fator σ^{ECF} é liberado do fator anti-σ cognato e se liga ao núcleo da RNA polimerase ativando a transcrição dos genes específicos. Além de sua atividade como inibidor, alguns fatores anti-σ também contribuem para a estabilidade do fator sigma, protegendo-o da atividade de proteases.

Em muitos aspectos, os fatores σ e anti-σ funcionam como um sistema de regulação de dois-componentes composto por uma proteína de transmembrana com um domínio de histidina quinase e um domínio regulador de resposta que, ao ser fosforilada, se liga ao DNA e ativa a transcrição. Tanto o mecanismo de regulação de dois-componentes quanto o mecanismo de regulação por fator anti-σ coordenam a resposta aos sinais de transcrição citoplasmáticos percebidos por um domínio sensor, localizado no periplasma.

No genoma de *Xac* foram anotados nove fatores σ^{ECF}, no entanto, ainda não haviam sido identificados os possíveis fatores anti-σ cognatos (da Silva *et al.*, 2002). Ao realizarmos ensaios de interação proteína-proteína através do sistema de duplo-híbrido, utilizando uma biblioteca de presas derivada de fragmentos de DNA genômico de *Xac*, foram observadas

interações com proteínas hipotéticas. Uma análise mais detalhada revelou que sete dos nove fatores σ^{ECF} testados interagiram com potenciais fatores anti-σ cognatos, uma vez que apresentam possíveis domínios transmembrana e são codificados por genes localizados ao lado dos gene que codificam os fatores σ^{ECF}. Dessa forma, podemos concluir que assim como nas demais bactérias, pelo menos sete dos nove fatores σ^{ECF} de *Xac* possuem um mecanismo de controle através dos fatores anti-σ.

Os fatores σ^{ECF} que não interagiram com potencias fatores anti-σ foram o $\sigma^{ECF}_{Xac1319}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4128}$. No caso de $\sigma^{ECF}_{Xac1319}$, foi descrito (na secção 4.6.4) que a proteína codificada pelo gene ao lado, Xac1320, possui uma região N-terminal de 100 aminoácidos com similaridade à proteína RseA, seguida por uma potencial hélice transmembrana (Figura 25). No entanto, o resto da molécula, o que corresponde ao provável domínio periplasmático, não apresenta similaridade de sequência com nenhuma outra proteína conhecida. A sequência do domínio periplasmático de Xac1320 (resíduos 120-296) apresenta características de uma proteína desenovelada, com conteúdo de 27% de alanina e 17% de prolina. Para o domínio citoplasmático, os valores são 18% de alanina e 6% de prolina e para a proteína inteira, os valores são 25% de alanina e 12% de prolina. Devido a isso, ainda não é claro de que forma este domínio periplasmático pode atuar como um sensor e a qual sinal o mesmo responde.

No caso do fator $\sigma^{ECF}_{Xac4128}$, o gene que codifica essa proteína se encontra ao lado, porém na direção aposta ao operon que codifica os genes do par $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e anti-$\sigma^{ECF}_{Xac4130}$. Logo, existe a possibilidade de que o fator anti-$\sigma^{ECF}_{Xac4130}$ pode desempenhar uma função, direta ou indireta, no controle da atividade ou da expressão de ambos os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac4128}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$. Um bom início para testar esta hipótese é realizar experimentos de RT-PCR quantificando a expressão do gene *Xac4128* nas cepas Δ*Xac4129*, Δ*Xac4130* e tipo selvagem. Outra observação interessante é o fato de que o gene *Xac4128* se localiza no início de um grande trecho de 32 kb que contém 17 genes (de *Xac4128* até *Xac4112*) co-lineares, a maioria

dos quais codificam componentes de um sistema de secreção de macromoléculas do tipo VI, ainda não caracterizado em *Xanthomonas* spp. Sistemas de secreção do tipo VI, descobertos somente em 2006, já foram relacionados tanto em processos de virulência quanto em respostas ao estresse (Pukatzki *et al*., 2006; Mougous *et al*., 2006; Bingle *et al*., 2008; Cascales, 2008). Testes de expressão deste locus poderiam ser feitos empregando os mutantes Δ*Xac4129* e Δ*Xac4130.*

5.2 Interação envolvendo o fator $\sigma^{FliA}_{Xac1933}$ responsável pela biossíntese de flagelo

Como já foi descrito de forma detalhada na secção 1.6, na maioria das espécies bacterianas, a expressão dos genes tardios na formação do flagelo é regulada de forma positiva pelo fator sigma FliA e de forma negativa pelo fator anti-sigma FlgM. O fator sigma FliA é mantido na forma inativa por interação com FlgM, sendo assim incapaz de associar-se com o núcleo da RNA polimerase. Na medida em que a estrutura do corpo basal e o gancho estão completos, o FlgM é secretado através da maquinaria de exportação flagelar para o meio extracelular, permitindo que o fator FliA livre possa se associar a RNA polimerase, ativando assim a transcrição dos genes tardios (Correa *et al*, 2004). Em *Xac*, o fator anti-sigma FlgM (Xac1989) interagiu com o fator sigma FliA (Xac1933) (Tabela 9) através de ensaios de duplo-híbrido, indicando um mecanismo de controle da ativação dos genes responsáveis pela formação de flagelo em *Xac* similar ao descrito para *Salmonella typhimurium, E.coli* e mais recentemente para *Xcc* (Figura 58) (Chicott & Hughes, 2010; Yang *et al*., 2009)

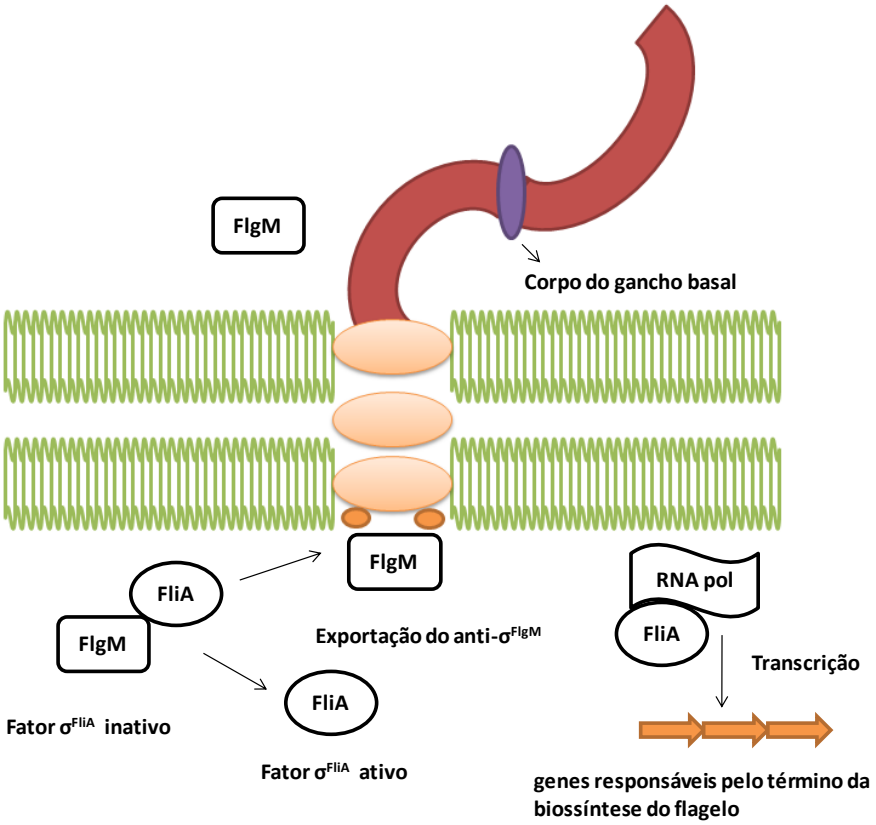


Figura 58: Modelo de regulação entre o fator sigma FliA e o fator anti-sigma FlgM. Durante a biossíntese do flagelo, o fator sigma FliA está na forma inativa, devido a interação com o fator anti-sigma FlgM. Na medida em que a estrutura intermediária do flagelo é formada, um sinal é enviado, o fator anti-sigma é exportado pela própria estrutura do flagelo e o fator sigma FliA interage com o núcleo da RNA polimerase, ativando a transcrição dos genes tardios, responsáveis pelo término da síntese de flagelo.

5.3 O papel do putativo estressomo RsbRST em *Xac*

A ativação do regulon do fator σ^B em *Bacillus subtilis* é governada por dois módulos "partner-switching" seqüencialmente ligados (Kang *et al*., 1996). O primeiro módulo (RsbR-RsbS-RsbT) é requerido na transmissão de sinais de estresse ambiental como, por exemplo, concentração de sais, choque-térmico e presença de álcool. Já o segundo módulo (RsbU-RsbV-RsbW) é requerido para transmitir sinais em resposta aos sinais enviados do primeiro módulo (Fouet *et al*., 2000) (Figura 59). Em *Xac*, foram encontrados homólogos para RsbR (Xac1269), RsbS (Xac1270) e RsbT (Xac1271). No entanto *Xac* não codifica homólogos para o segundo módulo e nem para o fator σ^B.

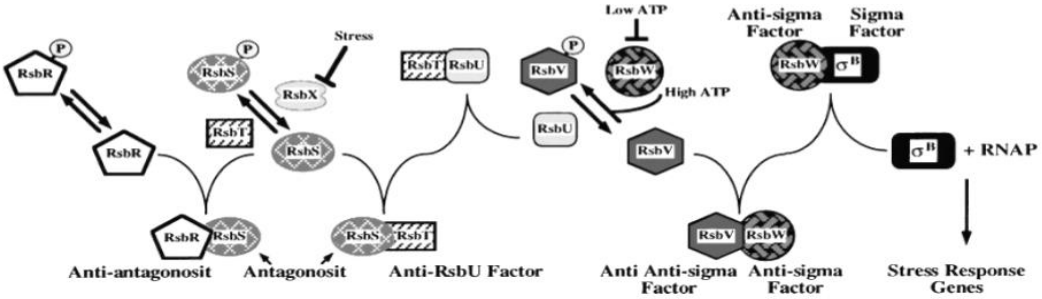


Figura 59: Na ausência de estresse, RsbW se liga ao fator σ^B, impedindo que ocorra a transcrição dos genes dependentes do σ^B. RsbW também é uma quinase e tem a função de fosforilar e inativar o seu antagonista RsbV. Em condições de crescimento que gera um estresse energético onde a concentração de ATP é baixa, há um acúmulo de RsbV não fosforilado e inibição de RsbW, consequentemente ativação dos genes dependentes do fator σ^B. Na ausência de estresse, RsbT está livre para interagir com RsbU, impedindo assim a desfosforilação de RsbV. Nessa condição, RsbW está livre para inibir o fator σ^B. RsbT é uma quinase que fosforila e inibe RsbS. Na presença de estresse ambiental, RsbX está inibido e RsbS-PO4 fosfatase está ativa para desfosforilar RsbS-PO4. O estresse induz a desfosforilação de RsbR. RsbS não fosforilado está livre para interagir com RsbT e/ou RsbR, interrompendo o complexo RsbT-RsbU. RsbU livre desfosforila RsbV-PO4 e RsbV não fosforilado está livre para interagir com RsbW. O fator σ^B livre interage com o núcleo da RNA polimerase e ativa os genes relacionados ao estresse (Hughes & Mathee, 1998).

Nas análises de interações proteína-proteína utilizando os homólogos a RsbR (Xac1269), RsbS (Xac1270) e RsbT (Xac1271) como isca, foram verificadas interações entre RsbR (Xac1269) e RsbS (Xac1270) e entre RsbS (Xac1270) e RsbT (Xac1271), além da interação de RsbT (Xac1271) com uma proteína sensora histidina quinase (Xac1273) (Tabela 9). A Dra Cássia Docena, em seu trabalho de doutorado realizado no nosso laboratório, estendeu esta rede de interações quando ela identificou a interação de Xac1273 com Xac1271. O gene *Xac1272* está localizado à jusante de *Xac1271* e codifica uma proteína que possui um domínio HATPase (domínio de ligação a ATP) na região N-terminal com similaridade à proteína RsbW de *B. subtilis*, além de um domínio com similaridade a SpoIIE, uma proteína fosfatase também de *B. subtilis.* Esses resultados indicam a possibilidade de que Xac1272

desempenhe funções similares à proteína RsbU de *B.subtilis*. Além disso, os genes *Xac1273* e *Xac1274*, que codificam proteínas de dois-componentes, também estão associados a esse módulo (Figura 60). A Dra Cássia Docena também identificou a interação de Xac1274 com um regulador de transcrição da família LysR. Os reguladores de transcrição da família LysR estão presentes em diversos gêneros de bactéria e são envolvidos em diferentes funções celulares, incluindo a fixação de nitrogênio, resposta ao estresse oxidativo e a virulência (Galperin, 2004). Também foram identificadas as interações de uma proteína histidina quinase Xac3673 com RsbT, com um anti-anti-σ (Xac0570) e com o $\sigma^{E}_{Xac1682}$. O fator anti-anti-σ Xac0570 está localizado num operon formado por Xac0570-Xac0571-Xac0572, sendo que o gene *Xac0571* codifica uma proteína homologa de RsbW de *B.subtilis.*

Dessa forma, os resultados das interações obtidas indicam que da mesma maneira que as proteínas do regulon do fator σ^{B} (RsbR, RsbS, RsbT, RsbU, RsbV, RsbW e RsbX) interagem para controlar a atividade do σ^{B} em *B. subtilis* (Figura 60), em *Xanthomonas*, Xac1269/Xac1270/Xac1271/Xac0570/Xac0571/Xac0572 interagem para talvez controlar a atividade do fator σ^{E} (Xac1682) através da proteína histidina quinase Xac3673 (Figura 60).

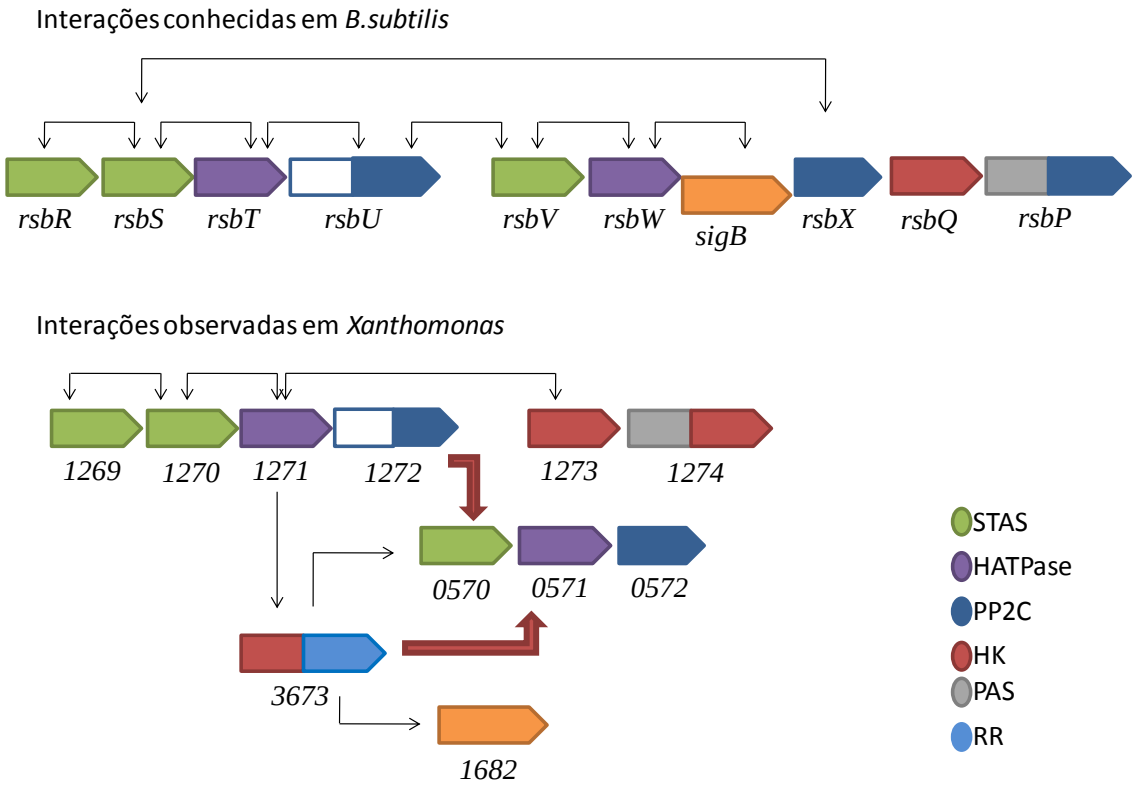


Figura 60: Representação esquemática das interações observadas envolvendo o putativo estressomo Xac 1269/Xac1270/Xac1271 em *Xac* e a comparação com as interações envolvendo os dois módulos RsbR/RsbT/RsbT e RsbU/RsbV/RsbW conhecidos em *B.subtilis*. A legenda em cores representa os domínios presentes nas proteínas Rsb de *B.subtilis* e de *Xac*. STAS: domínio presente em transportadores de fosfato e nos fatores antagonista dos fatores anti-σ; HATPase: domínio quinase presente em proteínas de sistema de dois-componentes; PP2C: proteína fosfatase 2C dependente de Mn+2/ Mg+2; HK: domínio histidina quinase presente em proteínas de sistema de dois componentes; PAS: domínio sensor de sinais; RR: domínio regulador de resposta. As setas em vermelho indicam o provável mecanismo de controle do fator σ^E, ou seja, as interações do putativo estressomo Xac1269/Xac1270/Xac1271 e de Xac0570/Xac0571/Xac0572 mediada por Xac3673.

5.4 O fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ está envolvido na resposta ao choque térmico em *Xac*

A resposta ao estresse controlada pelo fator σ^E depende do microorganismo hospedeiro. Por exemplo, em *Salmonella typhimurium*, esse fator é necessário para a virulência, para a resposta ao choque térmico e para a sobrevivência na fase estacionária (Testerman *et al.*, 2002; MacMeechan *et al.*, 2007), enquanto que em *Mycobacterium tuberculose* e *E. coli*, o mesmo é induzido por dodecil sulfato de sódio (SDS), H_2O_2 e choque térmico (Erickson & Gross, 1989; Raman *et al.*,2001). Em *Pseudomonas aeruginosa*, o σ^E

(conhecida como AlgU) está relacionado com a biossíntese de alginato (Schurr *et al*., 1996) e os mutantes de AlgU apresentam uma sensibilidade maior aos produtos halogenados quimicamente ou enzimaticamente e também uma maior sensibilidade a ação fagocítica (Humphreys *et al*., 1999). Outros fatores σ^E são importantes para proteger as células de danos no envelope celular (Hong *et al*., 2002; Butcher & Helmann, 2006).

Em *E.coli*, o fator σ^E (codificado pelo gene *rpoE*) é induzido por choque térmico e por etanol, através da geração de proteínas desenoveladas no periplasma (Mecsas *et al*., 1993; Missiakas *et al.,* 1996). Mutantes do σ^E apresentam uma sensibilidade maior a altas temperaturas, mas são viáveis a 30°C, indicando que esse fator não é essencial para a sobrevivência da bactéria em temperaturas baixas (De Las Peñas *et al*., 1997).

O fator σ^E é regulado por um fator anti-σ (RseA) e por uma proteína periplasmática (RseB). Dessa forma, foi verificado que a superexpressão de RseA prejudica o crescimento da bactéria (De Las Peñas *et al*., 1997; Missiakas *et al.,* 1997). Algumas explicações para a toxicidade observada para a superexpressão de RseA são: (I) inibição do fator σ^E; (II) inibição de uma outra proteína essencial para o crescimento celular; (III) outros efeitos tóxicos, como alterações na membrana devido ao aumento da quantidade de RseA e do complexo RseA-σ.

Recentemente foi demonstrado que σ^E em *Burkholderia pseudomallei* desempenha um papel crucial na tolerância ao estresse e na formação de biofilme. Mutantes σ^E mostraram-se mais sensíveis ao estresse oxidativo e ao estressse osmótico, além de apresentarem uma diminuição na sobrevivência intracelular. Como *Burkholderia pseudomallei* é um saprófita encontrado no solo e pode sobreviver em células eucarióticas, bem como em fagócitos, a bactéria desenvolveu mecanismos de regulação para a adaptação a esses ambientes estressantes, de alta osmolaridade e particularmente enriquecidos em radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (Thongboonkerd *et al*., 2007). Uma análise do mutante σ^E em *Burkholderia pseudomallei* indicou uma diminuição da virulência em relação à cepa

selvagem, provavelmente devido à ausência de alguns fatores de virulência e de reguladores transcricionais de grande importância para a sobrevivência da bactéria na célula hospedeira. Estes dados ressaltam a importância do σ^E em diferentes bactérias.

Como já foi mencionada na secção 4.6.4, durante a anotação do genoma de *Xac*, foram identificados três genes que codificam homólogos ao fator σ^E de *E.coli*. Através de uma análise mais apurada de comparações entre os genomas de *Xac*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *X. fastidiosa e B. pseudomallei*, foram observadas as identidades apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12: Identidade entre os três fatores σ^{ECF} (Xac1319, Xac1682 e Xac1380) de *Xac* e os fatores σ^E de *E.coli*, *P. aeruginosa*, *X. fastidiosa* e *B. pseudomallei* (dados obtidos utilizando Blastp).

Fator σ^E	*E.coli* (*rpoE*)	*P. aeruginosa* (*algU*)	*X. fastidiosa* (*rpoE*)	*B. pseudomallei* (*rpoE*)
$\sigma^{ECF}_{Xac1319}$	59%	63%	73%	61%
$\sigma^{ECF}_{Xac1682}$	32%	31%	30%	27%
$\sigma^{ECF}_{Xac1380}$	29%	33%	35%	34%

Estas comparações nos permitem afirmar que em *Xac*, o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1319}$ provavelmente corresponde ao verdadeiro ortólogo do fator σ^E de *E. coli* (ver também a seção anterior, 5.1, sobre a provável função do anti-$\sigma_{Xac1320}$). No entanto, ainda resta a dúvida dos papéis dos outros dois homólogos em *Xac*. Nesse trabalho, foram realizadas diversas tentativas de gerar nocautes individuais para os três homólogos de σ^E, no entanto, após inúmeras dificuldades enfrentadas, foi possível obter apenas a cepa mutante ΔXac1682.

Para analisar se o $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ está envolvido na regulação da adaptação a estresses ambientais, as culturas de *Xac* selvagem e mutante ΔXac1682 foram submetidas ao choque térmico a 45°C, ao estresse a 1,5% de etanol e ao estresse oxidativo. Os resultados revelaram que o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ não contribui nem para a adaptação da bactéria ao estresse oxidativo e

nem para o provocado por etanol. No entanto, em comparação com a cepa selvagem, a cepa mutante ΔXac1682 apresentou maior sensibilidade ao choque térmico a 45°C (Figura 29). Quanto à patogenicidade e à motilidade, tanto a cepa selvagem quanto a cepa mutante apresentaram o mesmo fenótipo, indicando que o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ não é requerido para essas funções nas condições testadas.

Portanto, os resultados das análises sugerem que o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ regula genes essenciais para a sobrevivência em resposta ao choque térmico. Esse dado é coerente com trabalhos publicados recentemente que descrevem resultados semelhantes para o fator σ^{E} em *Xylella fastidiosa* (da Silva Neto *et al*., 2007) e *Burkholderia cepacia* (Devescovi & Venturi, 2006). Ainda nesse trabalho, foi identificada a interação de $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ com a proteína Xac1681, que foi portanto designada como um fator anti-$\sigma_{Xac1681}$, apesar do fato de apresentar baixa similaridade com outros fatores anti-σ e de apresentar homólogos somente em bactérias do gênero *Xanthomonas* (dados não mostrados). Os genes *Xac1682* e *Xac1681* estão localizados ao lado do gene *Xac1680*, que codifica uma serina protease (Figura 61). Dessa forma, uma hipótese a ser testada é a de que outro mecanismo de transdução de sinal que ativa o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ possa ocorre através da degradação do anti-$\sigma_{Xac1681}$, provavelmente mediada pela protease Xac1680 (Figura 62).

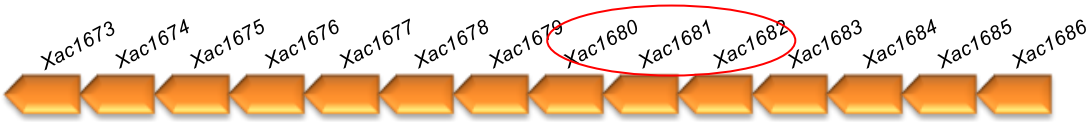


Figura 61: Representação da organização gênica do locus de 22kbp no genoma de *Xac*, contendo os genes que codificam o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$, o anti-$\sigma_{Xac1681}$ e a serina protease (Xac1680).

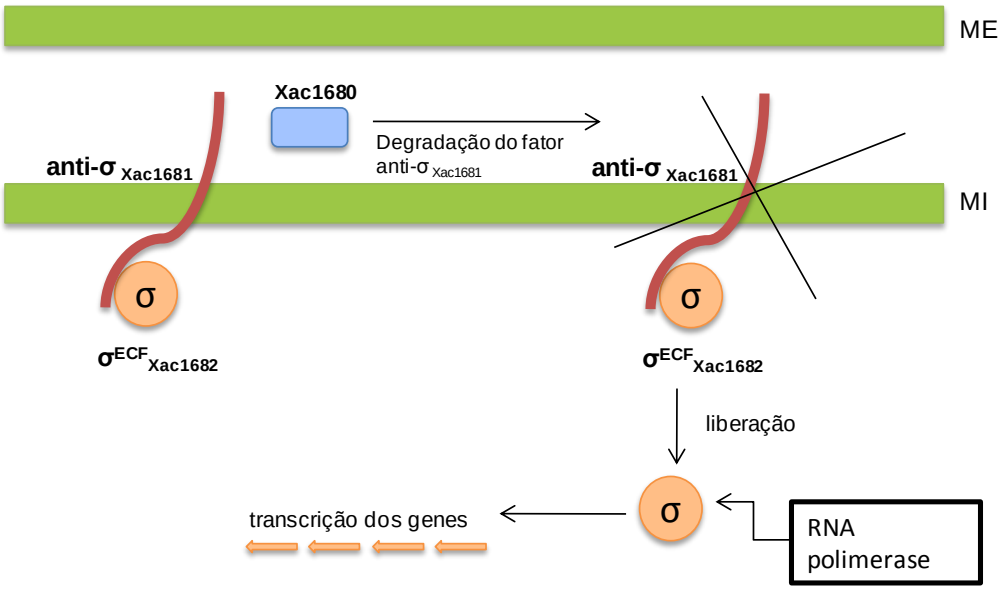


Figura 62: Representação do putativo mecanismo de transdução de sinal que ativa o fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$. A liberação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ ocorreria através da degradação do fator anti-$\sigma_{Xac1681}$ pela protease Xac1680.

Finalmente, uma observação importante é a de que os genes *Xac1681* e *Xac1682* se localizam dentro de um locus de 22 kpb composto por 14 genes (*Xac1673–Xac1686*), dos quais quase todos codificam citocromos ou enzimas envolvidas na síntese ou transporte dos seus cofatores (Figura 61 e Tabela 13).

Tabela 13. Proteínas codificadas pelo locus de 22 Kpb contendo os genes *Xac1681* e *Xac1682*.

Gene	Anotação*
Xac1686	homólogo citocromo B561
Xac1685	citocromo C
Xac1684	citocromo C2
Xac1683	proteína hipotética
Xac1682	fator sigma ECF, *rpoE*
Xac1681	proteína hipotética (putativo fator anti-σ)
Xac1680	serina protease
Xac1679	proteina biogênese citocromo C, ccmC, proteína C exportadora de heme
Xac1678	proteína D exportadora de heme
Xac1677	proteina CcmE, biogênese citocromo C , *cycJ*
Xac1676	proteina CcmF, biogênese citocromo C, *cycK*
Xac1675	proteína CcmG, biogênese citocromo C
Xac1674	proteina CcmH , biogênese citocromo C, *cycL*
Xac1673	proteína hipotética

*Anotações derivadas da database KEGG (http://www.genome.jp)

5.5 O fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ é envolvido no mecanismo de formação de flagelo

Xanthomonas axonopodis pv.citri é uma bactéria monótrica, ou seja, possui um único flagelo polar (Swings & Civerolo, 1993; Moreira *et al.*, 2005). Existe uma variedade de

maneiras pelo qual as bactérias se locomovem e a motilidade bacteriana é importante tanto para a colonização de ambientes quanto para a quimiotaxia. Os diferentes modos de motilidade incluem “swimming” e “swarming”, que são dependentes de flagelo, e “twitching”, “gliding” e “sliding”(Harshey, 2003). Os flagelos são organelas filamentosas e complexas, capazes de impulsionar as bactérias através de meio líquido (“swimming”), em ambientes viscosos e também ao longo de uma superfície (“swarming”), de modo que as bactérias possam se mover em direção a um ambiente mais favorável. Na estrutura da base de um flagelo, localizada no envelope celular, existe um motor rotativo e reversível, no qual a energia necessária é adquirida da força motriz de prótons ou de sódio. O motor é composto por duas partes: a parte rotativa (rotor), conectada ao gancho e ao filamento, e a parte não rotativa, que conduz íons acoplados para a produção de energia (Terashima *et al*., 2008).

O mecanismo de expressão gênica de forma hierárquica permite que a bactéria controle a produção e a montagem das subunidades do flagelo em resposta a sinais ambientais e a organelas estruturais intermediárias. O mecanismo de regulação de expressão foi muito bem estudado e caracterizado em *E.coli* (Komeda, 1986) e *Salmonella typhimurium* (ver secção 1.6) (Kutsukake *et al*., 1990). No entanto, a existência de três níveis de controle da expressão dos genes flagelares coordenados por FlhD e FlhC não se generaliza para os sistemas peritricosos.

Algumas cepas de *E.coli* possuem um sistema flagelar adicional semelhante ao de *Vibrio parahaemolyticus*, onde os fatores σ^{54} e σ^{FliA} controlam as expressões dos genes flagelares de classe II , III e IV (Dasgupta *et al*., 2003). Em comparação, o controle da expressão dos genes flagelares em *Caulobacter crescentus* é regulada por fosforilação do regulador do ciclo celular CtrA e a expressão dos genes “tardios”, ou seja, a classe IV, dependem do fator de transcrição dependente do fator σ^{54} FlbD (Jones *et al.*, 2001). Em *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila* e *Vibrio cholerae*, a expressão dos genes “precoces”

depende de reguladores dependentes do fator σ^{54}, enquanto que a expressão gênica tardia na maioria das vezes é controlada pelo fator σ^{FliA} e pelo anti-σ FlgM (Dasgupta *et al*., 2003; Weissenberger *et al*., 2010; Syed *et al*., 2009).

A motilidade do tipo "swarming" é uma forma especializada de locomoção em superfície, realizada por bactérias flageladas, sendo distinta da motilidade do tipo "swimming", que ocorre em meio líquido (também dependente de flagelo). As bactérias dos gêneros *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Serratia*, *Salmonella* e *Escherichia*, quando cultivadas em uma superfície úmida e rica em nutrientes, sofrem a indução de diferenciação celular para "swarmer cell", formando células geralmente alongadas, multinucleadas e hiperflageladas (Fraser & Hughes, 1999; Allison & Hughes, 1991; Harshey, 1994; Eberl et al., 1999). Em *Pseudomonas* e em *Salmonella* as colônias secretam grandes quantidades de "slime", uma mistura complexa de polissacarídeo, surfactantes, proteínas, peptídeos e aminoácidos, que são importantes para o contato célula-célula durante o "swarming". A diferenciação para o "swarmer cell" é estimulada pela superfície de contato, por exemplo, quando a viscosidade do meio aumenta ou quando o flagelo está associado com anticorpos do hospedeiro. Este último caso pode ser uma forma de defesa da bactéria para escapar do sistema imune do hospdeiro (Fraser & Hughes, 1999). Associações de células "swarmers" aderidas ao tecido do hospedeiro pode aumentar a resistência e facilitar a patogênicidade.

Em *Vibrio parahaemolyticus*, cada célula é adaptada para a locomoção em diferentes circunstâncias. As células "swimmer" possuem um único sistema flagelar polar (Fla), responsável pela natação da célula em meio líquido, enquanto que as células "swarmer" sintetizam um sistema flagelar adicional, o flagelo lateral (LAF), importante para o movimento através de um substrato sólido (McCarter, 2001).

Recentemente, foi demonstrado em *Xanthomonas campestris* pv. campestris (*Xcc*) a expressão de três classes de promotores flagelares, dependentes dos fatores σ^{70}, σ^{54} e σ^{FliA},

respectivamente. O nocaute do fator σ^{54} (*RpoN2*) de *Xcc* resultou em ausência de flagelo e alteração da motilidade (Yang *et al*., 2009).

Em *Xac*, o fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ possui 92% de identidade com RpoN2 (Xcc1935) de *Xcc*. O gene *Xac1969* está localizado no genoma próximo ao locus de 20 kpb constituído por genes responsáveis pela biossíntese de flagelo da bactéria, sugerindo que o fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ possa estar envolvido na regulação desses genes. Análises de interação no sistema duplo-híbrido mostraram que esse fator interage com um regulador transcricional com o domínio LysR, presente em proteínas que atuam como repressores ou ativadores da transcrição de genes que codificam fatores de virulência e formação de flagelo. Em ensaios de patogenicidade realizados com a cepa mutante ΔXac1969 mostraram o mesmo fenótipo que a cepa selvagem de *Xac*.

A relação entre o fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ e a motilidade foi observada através de ensaios do tipo "swimming" com a cepa nocaute ΔXac1969. Os resultados mostraram que a motilidade do tipo "swimming" foi alterada no mutante, uma vez que a zona de natação foi menor dessa cepa quando comparada com a cepa selvagem (Figura 23). Estes resultados sugerem que o fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ pode estar envolvido na ativação dos genes relacionados com a formação de flagelo, assim como tem sido observado em homólogos de outros organismos.

A motilidade do tipo "swarming", mecanismo de locomoção da bactéria em superfícies úmidas ou semi-sólidas, também é dependente de flagelo. Supreendentemente, a cepa mutante ΔXac1969 apresentou uma hipermotilidade em ensaios de swarming (Figura 21), ou seja, um fenótipo oposto ao esperado. Outros estudos em nosso laboratório revelaram que a motilidade na superfície do meio SB ágar (0,5%) não foi reduzida drasticamente no mutante ΔfliC (Figura 21), e até mesmo um aumento significativo da motilidade deste mutante foi observado em placas de Eiken ágar (0,6%) (Maxuel O. Andrade, dados não mostrados). Dessa forma,

nós concluimos que a motilidade observada nesses ensaios é diferente da motilidade "swarming".

Uma explicação para a observação de motilidade inesperada é que colônias exibindo "swarming" muitas vezes produzem biosurfactantes ou moléculas de superfície que atuam como agentes umidificantes. Em *Pseudomonas aeruginosa*, os surfactantes são conhecidos como "rhamnolipideos" e a biossíntese dos mesmos depende dos genes *rlhAB.* Mutações no gene *rlhA* inibem a motilidade "swarming" e não afeta a motilidade "swimming" (Klöler *et al*., 2000; Tremplay *et al*., 2007). Gotting e colaboradores (2007) demonstraram que a cepa Δ*gumD* de *Xac* (gene responsável pela produção de goma xantana) sofreu uma redução drástica em ensaios de motilidade similares aqueles descritos nesta tese, indicando a dependência com a produção de goma xantana Por isso, quantificamos a produção de goma xanthana na cepa Δ*Xac1969* e observamos um aumento de 80% na produção deste polissacarídeo, sugerindo que a hipermotilidade observada seja relacionada a essa alta produção.

Murray e Kazmierczak (2008), demonstraram que *P. aeruginosa* pode exibir uma motilidade denominada "sliding" em superfícies de ágar na ausência de flagelo e de pilus do tipo IV (Murray & Kazmierczak, 2008). "Sliding" é um mecanismo de transporte passivo correlacionado com a secreção de surfactantes, como rhamnolipídeos, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos e glicolipídeos que reduzem a tensão superficial entre a célula e a superfície. Dessa forma as forças de expansão da cultura em crescimento são empregadas para a locomoção. (Harshey, 2003; Brown & Hase, 2001). Com base nesses dados, nós sugerimos então que a hipermotilidade observada para o mutante Δ*Xac1969* e também para o mutante Δ*fliC* em algumas condições, deve ser denominada como motilidade "sliding". Este fenótipo também foi observado para mutantes de *Xac* deficientes na formação de pilus do tipo IV (Guzzo *et al.*, 2009).

5.6 Investigação dos possíveis papéis dos fatores sigma Xac2191 e Xac4129 e dos fatores anti-sigma Xac2192 e Xac4130 na cascata de ativação do sistema TTSS em *Xac*

Pesquisas realizadas sobre a patogenicidade bacteriana têm permitido uma melhor compreensão das interações entre patógenos e hospedeiros nos níveis celulares e moleculares. As análises genéticas dos fatores de virulência das bactérias têm demonstrado que os patógenos são distintos dos não patógenos. Os genes específicos para a patogenicidade muitas vezes são organizados em grupos de genes ("ilhas de patogenicidade") e aparentemente são herdados durante a evolução através da transferência genética por via horizontal. Um importante determinante patogênico empregado por muitas bactérias Gram-negativas é o sistema de secreção do tipo III (TTSS). Codificado por um conjunto de aproximadamente 20 genes, o TTSS é empregado para secretar e injetar fatores de virulência no citosol das células hospedeiras.

A expressão do sistema de secreção do tipo III é dependente das condições ambientais, que geralmente correspondem às condições encontradas pela bactéria durante a infecção no hospedeiro. Em muitos casos, a transcrição dos genes responsáveis pela montagem da maquinaria do sistema de secreção do tipo III é controlada por uma rede de múltiplos reguladores, que integram um conjunto diversificado de estímulos ambientais. Em fitopatógenos, o lócus que codifica o TTSS é denominado *hrp* ("*hypersensitive response and pathogenicity*").

Em *R. solanacearum*, os genes *hrp* são induzidos quando a bactéria entra em contato com a célula da planta (Aldon *et al*., 2000). Nessa situação, a bactéria recebe um sinal de indução, que é percebido por uma proteína de membrana externa PrhA, e transmite o sinal para PrhR, uma proteína de membrana interna, e para o fator σ PrhI. O fator σ PrhI ativa a transcrição do gene *prhJ*, que codifica um regulador transcricional capaz de ativar a

transcrição de *hrpG.* O regulador HrpG é considerado o principal ativador dos genes *hrp,* pois ativa a transcrição de *hrpB* (Brito *et al.*, 1999, 2002). Mutação em *prhA* inibe a indução dos genes TTSS contato dependente, no entanto, em meio mínimo, o sistema é induzido, sugerindo que um sinal distinto é percebido da célula do hospedeiro e do meio de cultura (Marenda et al.,1998). As proteínas HrpG e HrpB são requeridas para a expressão dos genes TTSS tanto em meio mínimo quanto em contato com a planta, enquanto PrhR, PrhI e PrhJ são requeridas especificamente para a indução do sistema em contato com a planta (Brito *et al.*, 2002).

Como descrito na secção 1.7 os TTSS foram divididos em dois grupos, chamados de I e II. O grupo II inclui os TTSS de *R. solanacearum* e de *Xac* (Aldon et al., 2000). Em *Xac,* os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e os fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ possuem grande similaridade ao fator σ PrhI e anti-σ PrhR de *R. solanceraum*, respectivamente. Um dos principais focos desse presente trabalho foi investigar a possibilidade do envolvimento de um destes dois fatores sigmas na cascata de ativação dos genes *hrp em Xac.* Ensaios de duplo híbrido revelaram as interações entre as regiões N-terminal dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ com os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129,}$ respectivamente (Figura 35).

Os estudos funcionais incluíram a produção das cepas mutantes dos genes *Xac2191, Xac4129, Xac2192, Xac4130* e do duplo mutante dos genes *Xac2191* e *Xac4129.* Os resultados dos ensaios em folhas de laranja pêra demonstraram que os mutantes dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ não alteraram a patogenicidade (Figura 46). Além disso, a expressão dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* não foram alteradas nas cepas mutantes. Estes resultados não apóiam a hipótese de que os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ são absolutamente requeridos para a expressão do TTSS e o desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico nas condições testadas.

Em *R.solanacearum*, a disrupção do gene *prhJ* aboliu completamente a expressão do TTSS e a patogenicidade (Brito *et al*., 2002). PrhJ é um fator de transcrição da família LuxR que ativa a transcrição de *hrpG*. *Xanthomonas* codifica nove proteínas com o domínio LuxR que são potenciais ativadores do gene *hrpG*. Com a finalidade de identificar o provável PrhJ em *Xac*, foram realizados experimentos de EMSA com o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e as regiões promotoras prováveis dos homólogos a PrhJ de *Xac* (*Xac0136, Xac0898, Xac1229, Xac1970, Xac2168, Xac3421, Xac3480, Xac3993* e *Xac4180*). Os resultados não mostraram interação em nenhum caso testado (Figura 44). Mediante a isso, duas hipóteses foram levantadas: 1) O fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ não está relacionado com a ativação da transcrição de homólogos de *prhJ*; 2) A proteína $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ recombinante purificada não possui a conformação nativa apropriada, visto que a mesma se encontrou insolúvel no primeiro passo de indução e teve que ser reenovelada com adição do detergente não-ionico N-lauroil-sarcosil.

Condições ambientais, incluindo a temperatura, composição do meio e pH também afetam a expressão dos genes do TTSS (Arlet *et al*., 1992; Huynth *et al*., 1989; Rahme *et al*., 1992; van Dijk *et al*., 1999; Wei *et al*., 1992). Os genes do TTSS dos fitopatógenos são reprimidos em meio rico, no entanto, são induzidos em meio mínimo. A ação inibitória em meio rico é exercida pelo elevado pH, osmolaridade e fontes complexas de carbono e nitrogênio. A indução no meio mínimo é exercida pelo meio mais ácido, baixa osmolaridade e pela presença de determinados açúcares como fonte de carbono. As expressões dos genes *hrp* são induzidas em meio XVM2 em *Xanthomonas campestris pv.vesicatoria* (*Xcv*) (Schulte & Bonas, 1992; Wengelnik & Bonas, 1996) e em *Xac* (Astua-Monge et al., 2005).

Uma segunda alternativa para investigar a existência de uma via em *Xac* homóloga à PrhA-PrhR-PrhI-PrhJ de *R. solanacearum* foi através da análise da expressão gênica em experimentos de qRT-PCR. As expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* foram analisadas em meio XVM2. Enquanto HrpG e HrpX são reguladores transcricionais, o produto codificado

pelo gene *hrcU* é uma subunidade conservada do TTSS, que possui um N-terminal constituído por várias hélices transmembrana e um domínio C-terminal citoplasmático. Em nosso laboratório, a Dra. Paola Alejandra Cappelletti demonstrou durante o seu trabalho de doutorado, que o disrupção no gene *hrcU* aboliu completamente a patogenicidade de *Xac* em laranja doce.

As análises de qRT-PCR mostraram que as expressões dos genes *hrpX* e *hrcU* foram induzidas em meio XVM2, no entanto, a expressão de *hrpG* não foi alterada. As expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* não foram alteradas nas cepas mutantes dos fatores anti-$\sigma_{Xac2192}$ e anti-$\sigma_{Xac4130}$ em meio não indutivo do TTSS (LB). Esses resultados demonstraram que a ausência dos fatores anti-σ não foram capazes de ativar as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* nesse meio. Também não foram alteradas, em relação à cepa selvagem, as expressões dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* nas cepas mutantes dos fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$, $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ e no duplo mutante para esses fatores, indicando que a via de ativação dos genes *hrp* em *Xac* ocorre de forma diferente a descrita em *R. salancearum*.

Como mencionado na secção 4.6.6.4, na via de ativação do TTSS em *Ralstonia solanacearum*, o fator σ PrhI ativa a transcrição de *prhJ*. Dessa forma, se essa via fosse similar em *Xac*, seria possível identificar o verdadeiro homólogo de PrhJ (Xac0136, Xac0898, Xac1229, Xac1970, Xac2168, Xac3421, Xac3480, Xac3993 ou Xac4180) através da análise das expressões desses genes nas cepas mutantes dos fatores σ, uma vez que na ausência desse fator σ não é esperado que ocorra transcrição do homólogo *prhJ* regulado pelo mesmo. Os resultados de PCR quantitativo mostraram que os níveis de expressão para todos os homólogos *prhJ* analisados foram semelhantes (Figura 50), ou seja, os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$, $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ certamente não controlam a transcrição desses genes.

Recentemente, Yoshimochi e colaboradores (2009), demonstraram uma segunda via de ativação do gene *hrpB* em *R. solanacearum* através de um sistema de dois-componentes

que ativa HrpG. Essa segunda via envolve uma modificação pos-traducional em HrpG por fosforilação (Yoshimochi *et al*., 2009). Em nosso laboratório, foi verificado através de ensaios de duplo-híbrido em levedura, a interação de HrpG com Xac3683, uma proteína com um domínio regulador de resposta (RR) e um domínio histidina quinase (HK) (Alegria *et al*., 2004). No entanto, também em nosso laboratório, foi demonstrado pelo aluno Maxuel de Andrade que a mutação dessa histidina quinase não alterou a virulência. Dessa forma, podemos especular que a fosforilação de HrpG pode estar relacionado com outras histidinas quinases ainda não identificadas.

A função do gene *hrpG* foi observada através de análises do seu nocaute apolar. Os testes de patogenicidade feitos com a cepa nocaute mostraram que HrpG é o regulador principal do locus *hrp*, uma vez que a virulência foi totalmente abolida em folhas de laranja pêra (Figura 51). Também foram analisados os níveis de expressão dos genes *hrpX* e *hrcU* em meio XVM2 em comparação com a cepa tipo selvagem e a mutante de *hrpG*. Os resultados revelaram que HrpG é fundamental para ativar a transcrição de *hrpX* e, dessa forma, podemos especular que HrpX provalvelmente ativa a transcrição dos genes *hrp*, incluindo *hrcU* (Figura 53), de acordo com o observado em *R. solanacearum* (Brito *et al*, 2002), *Xanthomonas campestris* pv vesicatoria (Wengelnik *et al.*, 1996) e *Xanthomonas oryzae pv.oryzicola* (Zou *et al*., 2006).

Nosso conhecimento e compreensão da cascata de regulação dos genes *hrp* em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri ainda é pouco desenvolvida. Os resultados acumulados neste trabalho indicam fortemente que a ativação dos genes *hrpG*, *hrpX* e *hrcU* em *Xac* aparentemente é controlado por uma via diferente da via de transdução de sinal mediada por PrhA-PrhR-PrhI-PrhJ-HrpG-HrpX descrita em *R.solanacearum*, uma vez que mutantes para os fatores σ e fatores anti-σ de *Xac* mais similares a PrhI e PrhR de *R. solanacearum* não

afetaram a patogenicidade em folhas de laranja pêra, nem a expressão dos genes *hrpG, hrpX, hrcU* e dos potenciais ortólogos de *prhJ*.

Trabalhos publicados nos últimos anos têm demonstrado que a ativação do TTSS pode ocorrer via um sistema de dois-componentes como, por exemplo, em *Salmonella* (Ganesh *et al*., 2009; Aguirre *et al*., 2006) e em *Edwarsiella* (Tan *et al*., 2005). Sistemas de regulação de dois-componentes presentes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são responsáveis por regular uma grande variedade de processos biológicos em resposta a mudanças ambientais. Entre esses processos, incluem a produção de antibióticos, a expressão de várias toxinas e a produção de proteínas relacionadas com a virulência e patogenicidade (Falke *et al*., 1997; Stock *et al*., 2000; West & Stock, 2001; Beier & Gross, 2006). Os sistemas de dois-componentes são geralmente constituídos de duas proteínas, uma histidina quinase (HK) e um regulador de resposta cognato (RR). Estes domínios podem se encontrar no mesmo polipeptídeo ou em polipeptídeos diferentes. Uma HK típica é uma proteína receptora de membrana com um domínio sensor N-terminal extracelular e um domínio C-terminal citossólico. Este último é formado por domínios de dimerização (HisKA) e de ligação ao ATP (HATPase), necessários para a autofosforilação no resíduo de histidina e transferência do grupo fosfato para resíduos de aspartato na proteína reguladora de resposta (RR). A fosforilação induz uma mudança conformacional no C-terminal, o que resulta na sua ativação e na transmissão do sinal. Em muitos casos, os domínios RR são associados a outros domínios que funcionam como fatores de transcrição (Stock *et al*., 2000).

Um dos exemplos de sistema de dois-componente muito bem caracterizado é o mediado por PhoPQ em bactérias Gram-negativa, como por exemplo, *Salmonella typhimurium* (Regelmann *et al*., 2002), *Neisseria meningitidis* (Rustam *et al*., 2006), *Yersinia pseudotuberculosis* (Marceau *et al*., 2004) e *P. aeruginosa* (Lesley & Waldburger, 2001). O sistema é essencial para a virulência, pois regula uma variedade de funções, incluindo

invasão, motilidade, transporte de pequenas moléculas, tolerância à ambiente ácido, resistência a peptídeos antimicrobianos e remodelamento da superfície bacteriana (Fields *et al*., 1989; Behlau & Miller, 1993; Soncini et al., 1996; Guo *et al*., 1997; Bearson *et al*., 1998; Adams *et al*., 2001). PhoQ é uma proteína sensora histidina quinase e PhoP é um regulador de resposta da família OmpR com domínio que atua com um ativador de transcrição (Miller, 1991). Barder e colaboradores (2005) demonstraram que o reconhecimento de peptídeos antimicrobianos por PhoQ é importante para desencadear a virulência em patógenos (Barder *et al*., 2005). O mecanismo de virulência mediado por PhoP em *Xoo* é similar ao observado em patógenos animais (Monsieurs et al., 2005) e no fitopatógeno *Erwinia chrysanthemi* (Llama-Palacio *et al*., 2003; Llama-Palacio *et al*., 2005). A presença de sinais ambientais como concentração de Ca^{2+}, Mg^{2+}, fosfato e presença de peptídeos é percebida por PhoQ, que sofre autofosforilação e transfere o grupo fosfato para um resíduo de aspartato na proteína PhoP. A proteína PhoP fosforilada torna-se ativa, ligando-se ao DNA e ativando a transcrição de genes dependentes de PhoP (Gunn & Miller, 1996).

Em *Xanthomomas oryzae* pv. oryzae (*Xoo*), o sistema de dois-componentes PhoPQ é regulado negativamente por outro sistema de dois-componentes RaxRH, uma vez que PhoP é altamente expresso na cepa mutante de RaxRH e mutantes de PhoP e PhoQ perdem a virulência, tornando-se mais sensíveis a agentes microbianos. Lee e colaboradores (2008) descreveram que o controle da expressão de *hrpG* e as respostas dependentes de HrpG são mediados pelo sistema de dois-componentes PhoPQ, principalmente através das concentrações de Ca^{2+}, Mg^{2+} e fosfato em *Xoo* (Lee *et al*., 2008). Em *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, o gene Xac4022 codifica a proteína PhoQ e o gene Xac4023 a proteína PhoP, que possuem grande similaridade em seqüência com as proteínas de dois-componentes PhoPQ de outras *Xanthomonas spp*. Os resultados obtidos nesse trabalho permitem especular que a ativação transcricional de *hrpG* provavelmente ocorre de forma semelhante ao descrito

em *Xoo* (Figura 63). No entanto, ainda não está claro a maneira pelo qual o sistema PhoPQ regula a expressão de *hrpG em Xanthomonas*. Diversos estudos ainda são necessários para esclarecer os mecanismos de ativação de HrpG em *Xac*.

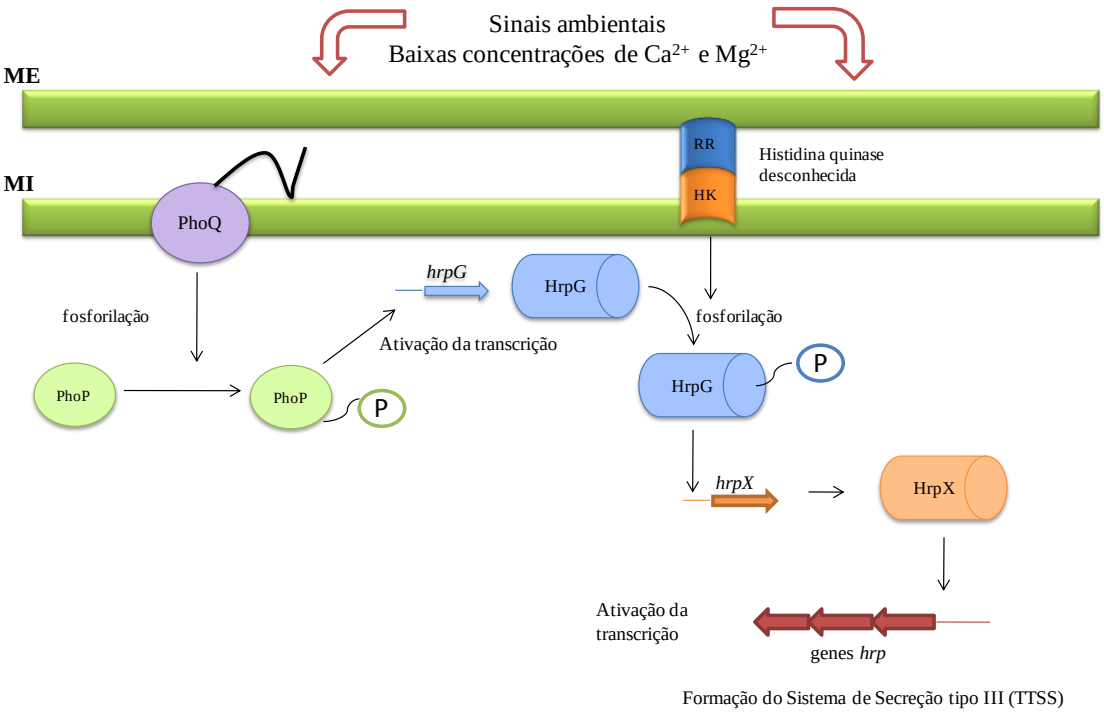


Figura 63: Representação esquemática da via PhoQP de ativação transcricional de *hrpG* e da ativação pós-traducional do regulador de virulência HrpG em *Xanthomonas*. A presença de sinais ambientais como baixa concentração de Ca^{2+}, Mg^{2+} e fosfato é percebida por PhoQ, uma quinase de membrana interna que sofre autofosforilação no resíduo de histidina e transferência do grupo fosfato para o resíduos de aspartato proteína PhoP, um ativador transcricional. A proteína PhoP fosforilada torna-se ativa, ligando-se ao DNA e ativando a transcrição de hrpG. HrpG é fosforilado por uma proteína quinase desconhecida, tornando-o ativo e capaz de ativar a transcrição de hrpX, que por sua vez ativa a transcrição do TTSS.

5.7 A participação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ na resposta a carência de ferro

O ferro é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento bacteriano. Embora seja abundante na natureza, sua disponibilidade é limitada devido à baixa solubilidade (Braun &. Killmann, 1999). As bactérias possuem múltiplos mecanismos de absorção desse elemento químico, que fornecem especificidade e afinidade as diferentes formas de ferro captado. Em

condições limitantes, as bactérias secretam sideróforos que facilitam a aquisição de íons férricos (Fe^{3+}).

Os mecanismos mais comuns de transporte de ferro em bactéria são aqueles que permitem a absorção de complexos de ferro, como por exemplo, sideróforos-ferro, complexos de grupo heme, transferrina-ferro, lactoferrina-ferro e citrato de ferro. Conforme descrito na secção 1.5.1, o transporte de complexo ligante-ferro depende de um receptor dependente de TonB na membrana externa, uma proteína periplasmática e um complexo de permeases (ABC transportadores) na membrana interna. Em *E.coli*, o transporte de ferro para o citoplasma é sinalizado pela baixa concentração de citrato férrico (Fe^{3+}), através do sistema dicitrato férrico. O Fe^{3+} é transportado para o periplasma através da membrana citoplasmática. A ligação do dicitrato de ferro à proteína FecA induz um sinal que é transferido da membrana externa para a membrana citoplasmática, e posteriormente para o citoplasma, através de FecR, uma proteína de transmembrana. Dessa forma, o fator σ FecI é ativado e ativa a transcrição dos genes *fecABCDE*, juntamente com o núcleo da RNA polimerase (Figura 9 da introdução) (Braun & Mahren, 2005). Além disso, outros mecanismos de transporte de ferro livre podem ser empregados, entre eles ABC permease-metal e transportadores SitABCD e MntH em *Salmonella* (Kehres *et al*., 2002; Zaharik *et al*., 2004).

A principal via de captação de íons ferroso (Fe^{2+}) ocorre através do sistema Feo (transporte de ferro ferroso-ferrous iron transport) codificado pelo operon *feoABC* (Cartron *et al*., 2006). O gene *feoB* codifica um transportador de ferro com domínio citoplasmático hidrofílico e um domínio de transmembrana (Kammler *et al*., 1993). O domínio citoplasmático da proteína FeoB em *E.coli* atua como uma GTPase e possui sequências similares a proteína G em eucariotos (Marlovits *et al.*, 2002). A conversão GTP/GDP é necessária para absorção eficiente do Fe^{2+} através do sistema de transporte FeoB dependente. Os papéis de *feoA* e *feoC* ainda são desconhecidos, no entanto, o gene *feoA* codifica uma

proteína ativadora GTPase (GAP) e o gene *feoC* um regulador transcricional. Em patógenos como *E.coli*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Porphyromonas gingivalis* e *Campylobacter jejuni*, a mutação do gene *feoB* apresenta deficiência na captação de Fe^{2+} e diminuição da virulência (Boyer *et al*., 2002; Dashper *et al*., 2005, Naikare *et al*., 2006; Robey & Cianciotto, 2002; Stojiljkovic, 1993; Velayudhan *et al*., 2000).

Já em *P. aeruginosa*, foram identificados homólogos de FecA, FecR FecI de *E.coli* (Poole & McKay, 2003; Vista *et al*., 2002; Ochsner *et al*., 2002), no entanto não foram identificados genes homólogos para os transportadores *fecBCDE*. O mecanismo de ligação de citrato férrico (Fe^{3+}) a receptores de membrana tem sido relatado nesse organismo (Harding & Royt, 1990). Em *E.coli*, o gene *fecA* e os genes adicionais responsáveis pelo transporte (*fecBCDE*) são induzidos em condições de carência de ferro e na presença de citrato de ferro exógeno (Braun, 2003, Braun & Mähren, 2005; Braun *et al.*, 2006; Visca *et al*., 2002). A ausência de genes homólogos para o transporte de citrato férrico, como permease, e o relato de que o mutante FeoB compromete a aquisição de ferro através do citrato, destacam um mecanismo de captação de ferro em *P.aeruginosa* diferente ao observado em *E. coli*. Esse sistema envolve o receptor de membrana externa FecA e o transportador citoplasmático de ferro (Fe^{2+}) FeoB (Marshall *et al*., 2009). Também foi relatado em *Leptospira biflexa* um mecanismo de captação de ferro mediado por FecA e FeoB. Essa bactéria também não possui homólogos aos transportadores FecBCDE de *E. coli* (Louvel *et al.*, 2005).

Recentemente, foi descrito em *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae a existência de sistemas de captação de ferro mediado por FeoB e por sideróforos (Pandey & Sonti, 2010). Em *Xac*, os fatores $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ e $\sigma^{ECF}_{Xac4129}$ possuem identidade de sequência de 47% e 49%, respectivamente, ao FecI de *E. coli* e 42% e 46%, respectivamente, ao PupI de *Pseudomonas putida*. No entanto, não foram encontrados homólogos para os transportadores de ferro

FecBCDE de *E. coli* em *Xac*, mas por outro lado, foram identificados os genes *feoB* (*Xac1855*) e *feoA* (*Xac1856*). No presente trabalho, curvas de crescimento realizadas em meio com carência de ferro mostraram que as cepas mutantes ΔXac2191 e ΔXac2191/ΔXac4129 apresentaram crescimento lento quando comparadas com as cepas selvagem e ΔXac4129. Dessa forma, pode-se especular que o fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ deve estar relacionado com o sistema de captação de ferro mediado por Xac2193 (receptor dependente de TonB) e por FeoB, de forma similar ao descrito em bactérias que não possuem homólogos para os transportadores FecBCDE de *E. coli*, como por exemplo, *X.oryzae*, *P. aeruginosa* e *L. biflexa* (Pandey & Sonti, 2010; Marshall *et al*., 2009; Louvel *et al*., 2005).

6. Conclusões

Xanthomonas axonopodis pv. citri é o agente causador do cancro cítrico, uma doença caracterizada por causar principalmente grande danos aos frutos. Os frutos infectados apresentam menor valor comercial ou não são comercializados, ocorrendo perdas econômicas significativas para a citricultura brasileira. O seqüenciamento do genoma de Xac revelou a existência de genes para 14 diferentes fatores sigmas. Esta diversidade poderia servir como fonte pelo qual esse fitopatógeno pode adaptar e sobreviver em diferentes ambientes. Iniciamos uma variedade de abordagens experimentais com o objetivo de entender a importância da grande variedade de fatores sigma em *Xac*.

Começamos com uma abordagem para identificar interações proteína-proteína envolvendo esses fatores sigmas. Ensaios de duplo-híbrido identificaram: Interações dos fatores σ^{ECF} (Xac2814. Xac3989, Xac0922, Xac1319, Xac1380, Xac1682, Xac4129 e Xac2191) e os fatores anti-σ cognatos (Xac2815. Xac3988, Xac0921, Xac1320, Xac1379, Xac1681, Xac4130 e Xac2192). Além disso, observamos interações entre o fator σ^{FliA} (Xac1933) e o anti-σ_{FlgM} (Xac1989), seu fator anti-σ cognato. Também detectamos interações que apontam para uma possível ligação entre o putativo estressomo RsbR(Xac1269)/RsbS(Xac1270)/RsbT(Xac1271) e Xac0570/ Xac0571/Xac0572 no controle do fator σ^{E} (Xac1682) através da proteína histidina quinase Xac3673.

Nocautes gênicos de alguns fatores sigmas foram produzidos. Estas cepas foram empregadas em experimentos que apontaram para o envolvimento do fator $\sigma^{54}_{Xac1969}$ no mecanismo de formação de flagelo, a contribuição do fator $\sigma^{ECF}_{Xac1682}$ na resposta ao choque térmico e a participação do fator $\sigma^{ECF}_{Xac2191}$ no crescimento bacteriano em condições de carência de ferro.

Finalmente, executamos uma série de experimentos para testar a hipótese que a expressão dos genes *hrp* em *Xac* é regulada por um mecanismo similar à via PrhARIJ

caracterizada em *R.solanacearum.* Cepas de *Xac* com nocautes nos genes mais similares a *prhI* e *prhR* de *R.solanacearum* foram produzidos: fator σ PrhI (Xac2191 e Xac4129) e o fator anti-σ PrhR (Xac2192 e Xac4130). Os resultados obtidos nos permitem fazer algumas colocações:

- O mecanismo de ativação dos genes *hrp* em *Xac* ocorre de maneira diferente ao observado em *R.solanacearum* (via PrhAIRJ)
- A ativação dos genes *hrp* depende de HrpG e HrpX
- HrpG é essencial para a patogenicidade

Diante disso, o presente trabalho contribuiu para o início de uma caracterização de alguns fatores σ em Xac. Nossos resultados deram os primeiros passos para futuras investigações sobre os papéis dos fatores σ desse importante fitopatógeno.

7. Referências bibliográficas

Abram D, Mitchen JR, Koffler H, Vatter AEDifferentiation within the bacterial flagellum and isolation of the proximal hook. J Bacteriol., v.101, p.250-61, 1970.

Ades SE. Control of the alternative sigma factor sigmaE in Escherichia coli. Curr Opin Microbiol., v.7(2), p.157-62, 2004. Review

Agrain C, Callebaut I., Journet L., Sorg I., Paroz C., Mota L. J. and Cornelis GR. Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol., v.56, p. 54-67, 2005.

Aguirre A, Cabeza ML, Spinelli SV, McClelland M, García Véscovi E, Soncini FC. PhoP-induced genes within Salmonella pathogenicity island 1. J Bacteriol., v.188(19), p.6889-98. 2006.

Aiyar SE, Juang YL, Helmann JD, deHaseth PL. Mutations in sigma factor that affect the temperature dependence of transcription from a promoter, but not from a mismatch bubble in double-stranded DNA. Biochemistry, v.38, p.11501-6, 1994.

Alba BM and Cross C.A Regulation of the *Escherichia coli*σ^E-dependent envelope stress response Molecular Microbiology, v.52(3), p. 613–619, 2004.

Albert-Weissenberger C, Sahr T, Sismeiro O, Hacker J, Heuner K, Buchrieser C. Control of flagellar gene regulation in Legionella pneumophila and its relation to growth phase.J Bacteriol., v.192(2),p.446-55, 2010.

Alegria MC, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS.New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen Xanthomonas axonopodis Pathovar citri J Bacteriol., v.186 (18), p.6186-97, 2004.

Alfano JR, Collmer A.. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annu. Rev. Phytopathol., v.42, p.385–414, 2004

Allison C, Hughes C. Closely linked genetic loci required for swarm cell differentiation and multicellular migration by Proteus mirabilis. Mol Microbiol., v.5(8), p.1975-82, 1991.

Amsler CD, Cho M, Matsumura P. Multiple factors underlying the maximum motility of Escherichia coli as cultures enter post-exponential growth. J Bacteriol., v.175, p.6238-44., 1993.

Andrade MO, Alegria MC, Guzzo CR, Docena C, Rosa MC, Ramos CH, Farah CS. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen Xanthomonas axonopodis pv citri. Mol Microbiol., v.62(2), p.537-51, 2006.

Archambault, J., Friesen, J.D. Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II and III. Microbiol Rev.v.57, p.703-724, 1993.

Arlat M, Gough CL, Zischek C, Barberis PA, Trigalet A, Boucher CA. Transcriptional organization and expression of the large hrp gene cluster of Pseudomonas solanacearum. Mol Plant Microbe Interact., v.5(2), p.187-93, 1992.

Barembruch C, Hengge R. Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of Escherichia coli are controlled by FlgM-modulated proteolysis. Mol Microbiol.,v.65, p.76-89, 2007.

Barne KA, Bown JA, Busby SJ, Minchin SD Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promotersEMBO J., v.16(13), p.4034-40, 1997.

Bashyam MD, Hasnain SE. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. Infect Genet Evol., v.4(4), p.301-8, 2004. Review.

Bingle LEH, Bailey CM, Pallen MJ "Type VI secretion: a beginner's guide". *Curr. Opin. Microbiol.* v.**11** (1), p. 3–8, 2008.

Bitter W, Marugg JD, de Weger LA, Tommassen J, Weisbeek PJ. The ferric-pseudobactin receptor PupA of Pseudomonas putida WCS358: homology to TonB-dependent Escherichia coli receptors and specificity of the protein. Mol Microbiol., v.5(3), p.647-55, 1991.

Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, Allaoui A.Structure and composition of the Shigella flexneri "needle complex", a part of its type III secreton. Mol Microbiol., v.39(3), p.652-63, 2001.

Boletin Fundecitrus [online]. Available: www.fundecitrus.com.br [Agosto, 2005].

Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Infect Immun. V.70(11), p.6032-42, 2002.

Braun V, Mahren S, Ogierman M. Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. Curr Opin Microbiol., v.6(2), p.173-80, 2003. Review.

Braun V, Mahren S, Sauter A. Gene regulation by transmembrane signaling. Biometals., v.18(5), p.507-17, 2005 Review.

Braun V. Iron uptake by Escherichia coli. Front Biosci., v.8, p.1409-21, 2003. Review.

Braun V. Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. Arch Microbiol., v.167(6), p.325-31, 1997. Review

Brito, B., et al. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling Ralstonia solanacearum hrp genes. Mol PlantMicrobeInteract.2002Feb;15(2):109-19.

Brown, II & Hase, C. C. Flagellum-independent surface migration of Vibrio cholerae and Escherichia coli. J. Bacteriol., v.183, p.3784–3790, 2001.

Browning, D.F., Busby, S.J. The regulataion of bacterial transcription initiation. Nat. Rev.Microbiol., v.2, p.57-65, 2004.

Brutinel ED, Yahr TL. Control of gene expression by type III secretory activity. Review. Curr Opin Microbiol.,v.11, p.128-33., 2008.

Büttner D, Bonas U. Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J., v.21(20), p.5313-22, 2002 Review.

Burger M, Woods RG, McCarthy C, Beacham IR. Temperature regulation of protease in Pseudomonas fluorescens LS107d2 by an ECF sigma factor and a transmembrane activator. Microbiology., v.146 Pt 12, p.3149-55, 2000.

Burrows PC, Severinov K, Ishihama A, Buck M, Wigneshweraraj SR. Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element. J Biol Chem., v.32, p. 29728-43, 2003.

Butcher BG, Helmann JD. Identification of Bacillus subtilis sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. Mol Microbiol., v.60(3), p.765-82, 2006.

Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG. A quorum sensing associated virulence gene of Pseudomonas aeruginosa encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. ProcNatl Acad Sci USA Dec., v.98 (25), p.14613-8, 2001.

Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. Biometals., v.19(2), p.143-57, 2006. Review.

Cascales E "The Type VI secretion toolkit". *EMBO Reports*., v.9 (8), p.735–741, 2008.

Chamberlin, M.J. The selectivity of transcription. Review Annu Rev Biochem., v.43, p.721-75, 1974.

Chatterjee A, Cui Y, Yang H, Collmer A, Alfano JR, Chatterjee AK. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. Mol Plant Microbe Interact., v.16(12), p.1106-17, 2003.

Chevance FF, Hughes KT. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. Review Nat Rev Microbiol., v.6, p.455-65., 2008.

Chi E, Bartlett DH. An rpoE-like locus controls outer membrane protein synthesis and growth at cold temperatures and high pressures in the deep-sea bacterium Photobacterium sp. strain SS9. Mol Microbiol., v.4., p.713-26, 1995.

Chilcott GS, Hughes KT. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli. Microbiol Mol Biol Rev. v.64(4), p.694-708, 2000 Review.

Chou FL, Chou HC, Lin YS, Yang BY, Lin NT, Weng SF, Tseng YH. The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. Biochem Biophys Res Commun., v.233(1), p.265-9, 1997.

Cross AH, Manning PT, Stern MK, Misko TP. Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination. J Neuroimmunol., v. 80(1-2), p.121-30, 1997

Cunnac S, Boucher C, Genin S. Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in Ralstonia solanacearum. J Bacteriol., v.186(8), p.2309-18, 2004.

da Silva AC., Ferro JA., Reinach FC., Farah CS., Furlan LR., Quaggio RB., Monteiro-Vitorello CB., Van Sluys MA., Almeida NF., Alves LM., do Amaral AM., Bertolini MC., Camargo LE., Camarotte G., Cannavan F., Cardozo J., Chambergo F., Ciapina LP., Cicarelli RM., Coutinho LL., Cursino-Santos JR., El-Dorry H., Faria JB., Ferreira AJ., Ferreira RC., Ferro MI., Formighieri EF., Franco MC., Greggio CC., Gruber A., Katsuyama AM., Kishi LT., Leite RP., Lemos EG., Lemos MV., Locali EC., Machado MA., Madeira AM., Martinez-Rossi NM., Martins EC., Meidanis J., Menck CF., Miyaki CY., Moon DH., Moreira LM., Novo MT., Okura VK., Oliveira MC., Oliveira VR., Pereira HA., Rossi A., Sena JA., Silva C., de Souza RF., Spinola LA., Takita MA., Tamura RE., Teixeira EC., Tezza RI., Trindade dos Santos M., Truffi D., Tsai SM., White FF., Setubal JC., Kitajima JP. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature, v.41, p.459-463, 2002.

Dasgupta N, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S, Ramphal R. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol.,v.3, p.809-24, 2003.

Dashper SG, Butler CA, Lissel JP, Paolini RA, Hoffmann B, Veith PD, O'Brien-Simpson NM, Snelgrove SL, Tsiros JT, Reynolds EC. A novel Porphyromonas gingivalis FeoB plays a role in manganese accumulation. J Biol Chem., v.280(30), p.28095-102, 2005.

De Feyter R.; Yang Y.; and Gabriel DW. Gene-for-genes interactions between Cotton R Genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum avr* genes. Molecular Plant-Microbe Interactions., v.6, p.225-237, 1993.

Dow JM, Osbourn AE, Wilson TJ, Daniels MJ. A locus determining pathogenicity of Xanthomonas campestris is involved in lipopolysaccharide biosynthesis.Mol Plant Microbe Interact., v.8(5), p.768-77, 1995.

Enz, S, *et al*.(2000) Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J Bacteriol*. Feb;182(3):637-46.

Enz, S, *et al*.(2003) Sites of Interaction between the FecA and FecR Signal Transduction Proteins of Ferric Citrate Transport in *E.coli* K-12. *J Bacterio* July, 185(3): 3745-3752

Erickson JW, Gross CA. Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression.Genes Dev., v.3(9), p.1462-71, 1989.

Firoved AM, Boucher JC, Deretic V. Global genomic analysis of AlgU (sigma(E))-dependent promoters (sigmulon) in Pseudomonas aeruginosa and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. J Bacteriol. v.184(4), p.1057-64, 2002.

Firoved AM, Deretic V. Microarray analysis of global gene expression in mucoid Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol., v.185(3), p.1071-81, 2003.

Flavier AB *et al* An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in Ralstonia solanacearum. Mol Microbiol.; v.28(3), p.475-86, 1998.

Fouet A, Namy O, Lambert G. Characterization of the operon encoding the alternative sigma(B) factor from Bacillus anthracis and its role in virulence. J Bacteriol., v.182(18), p.5036-45, 2000.

Fouts DE, Abramovitch RB, Alfano JR, Baldo AM, Buell CR, Cartinhour S, Chatterjee AK, D'Ascenzo M, Gwinn ML, Lazarowitz SG, Lin NC, Martin GB, Rehm AH, Schneider DJ, van Dijk K, Tang X, Collmer A. Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99(4), p.2275-80, 2002.

Frederick RD, Ahmad M, Majerczak DR, Arroyo-Rodríguez AS, Manulis S, Coplin DL. Genetic organization of the *Pantoea stewartii subsp. stewartii hrp* gene cluster and sequence analysis of the hrpA, hrpC, hrpN, and wtsE operons. Mol Plant Microbe Interact., v.14(10), p.1213-22, 2001.

Ganesh AB, Rajasingh H, Mande SS. Mathematical modeling of regulation of type III secretion system in *Salmonella enterica serovar Typhimurium* by SirA. In Silico Biol., v.9 (1-2), p.57-72, 2009.

García-ochoa F, Casas JA, Mohedano, AF. Precipitation of xanthan gum. Science Tecnology, v.28., p. 13003-113., 1993

Gaudriault S, Malandrin L, Paulin JP, Barny MA. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. Mol Microbiol., v.26(5), p.1057-69, 1997.

Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol Mol Biol Rev. v.68(4), p.771-95, 2004.Review.

Gietz *et al*. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/ single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. Technical Tips Online, 1998. [online].

Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu Rev Phytopathol. 2005;43:205-27. Review.

Gophna U., Ron EZ. and Graur D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by mutiple horizontaltransfer events. Gene, v. 312, p. 151–163, 2003.

Gorham HC, McGowan SJ, Robson PR, Hodgson DA. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. Mol Microbiol., v.1, p.19171-86, 1996.

Goto M, Yaguchi Y, Hyodo H. Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. Physiol.Plant Pathol., v.16, p.343-350, 1979.

Gottwald TR, Graham JH. A device for precise and nondiruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. Phytopathology, v.82, p.930-935, 1992.

Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbiol Rev., v.60(3), p.539-74, 1996. Review.

Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. Molecular Plant Pathology, v.5, p1-15, 2004.

Griffiths JC. Training in internal fixation of fractures. Br Med J., v.2(6152), p.1615-6, 1978.

Gross CA, Chan C, Dombroski A, Gruber T, Sharp M, Tupy J, Young B. The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. Cold Spring Harb Symp Quant Biol., v.63, p.141-155, 1998. Review.

Gruber TM, Cross CA. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annu.Rev.Microbiol., v.57, p.441-466,2003.

Guerinot ML, Yi Y. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. Plant Physiol., v.104(3), p.815-820, 1994.

Gürlebeck D, Thieme F, Bonas U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. J Plant Physiol., v.163(3), p.233-55, 2006 Review

Gunn JS, Miller SI. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol.v.178(23), p.6857-64, 1996.

Guzzo CR, Salinas RK, Andrade MO, Farah CS. PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. J Mol Biol., v.393(4), p.848-66, 2009.

Hahnenberger KM, Shapiro L. Organization and temporal expression of a flagellar basal body gene in *Caulobacter crescentus.* J Bacteriol., v.170(9), p.4119-24, 1988.

Hantke K. Iron and metal regulation in bacteria. Curr Opin Microbiol., v.4(2), p.172-7, 2001 Review

Harding RA, Royt PW. Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol., v.136(9), p.1859-67, 1990.

Harley CB, Reynolds RP. Analysis of *E. coli* promoter sequences. Nucleic Acids Res., v.15, p.2343-61., 1987.

Harris SJ, Shih YL, Bentley SD, Salmond GPThe hexAgene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. Mol Microbiol., v.28(4), p.705-17,1998.

Harshey, RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. Annu. Rev. Microbiol.,v. 57, p. 249–273, 2003.

Hawley DK, McClure WR. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Review. Nucleic Acids Res., v.11, p.2237-55, 1983

He SY., Nomura K., Whittam TS. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. Biochim. Biophys. Acta, v.1694, p. 181-206, 2004.

Hecker M, Völker U. General stress response of Bacillus subtilis and other bacteria. Adv Microb Physiol. v.44, p.35-91, 2001, Review.

Helmann JD, Chamberlin MJ. Structure and function of bacterial sigma factors. Annu Rev Biochem Review,v.57, p.839-72, 1988.

Hendrickson EL, Guevera P, Ausubel FM. The alternative sigma factor RpoN is required for hrp activity in *Pseudomonas syringae pv. maculicola* and acts at the level of hrpL transcription. J Bacteriol. v.182(12), p.3508-16, 2000.

Hirschman J, Wong PK, Sei K, Keener J, Kustu S. Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: evidence that the ntrA product is a sigma factor. Proc Natl Acad Sci U S A., v.82(22), p.7525-9, 1985

Hong HJ, Paget MS, Buttner MJ. A signal transduction system in Streptomyces coelicolor that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. Mol Microbiol., v.44(5),p.1199-1211, 2002.

Horns T, Bonas U. The rpoN gene of *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* is not required for pathogenicity. Mol Plant Microbe Interact., v.9(9), p.856-9, 1996.

Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v.62, p.379-433, 1998.

Hughes KT, Mathee K. The anti-sigma factors. Annu Rev Microbiol., v.52, p.231-86, 1998.

Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ. Entry of Xanthomonas campestris pv. campestris into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. Mol Plant Microbe Interact., v.(6), p.537-43, 1998.

Huguet E., Hahn C., Wengelnik K. and Bonas U. *hpaA* mutantes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. Mol. Microbiol., v.29, p. 1379-1390. 1998

Hunt TP, Magasanik B. Transcription of glnA by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and products of glnF, glnG and glnL. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, v.82, p.8453-8457, 1985.

Hutcheson SW, Bretz J, Sussan T, Jin S, Pak K. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in Pseudomonas syringae strains. J Bacteriol., v.183(19), p.5589-98, 2001.

Huynh TV, Dahlbeck D, Staskawicz BJ. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. Science., v.245(4924), p.1374-7, 1989.

James P., Halladay J. & Craig E. A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two- hybrid selection in yeast. Genetics. v.144, p.1425-1436, 1996.

Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. Nature., v.444(7117), p.323-9, 2006 Review

Jöres L, Wagner R . Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. J Biol Chem., v.19, p.16834-43, 2003.

Kamdar HV, Kamoun S, Kado CI. Restoration of pathogenicity of avirulent Xanthomonas oryzae pv. oryzae and *X. campestris pathovars* by reciprocal complementation with the hrpXo and hrpXc genes and identification of HrpX function by sequence analyses. J Bacteriol., v.175(7), p.2017-25, 1993.

Kammler M, Schön C, Hantke K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. J Bacteriol., v.175(19), p.6212-9, 1993.

Kang CM, Brody MS, Akbar S, Yang X, Price CW. Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma(b) in response to environmental stress. J Bacteriol.,v.178(13), p.3846-53, 1996.

Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME. SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol., v.184(12), p.3159-66, 2002.

Kim JG, Kang Y, Jang JY, Jog GJ, Lim JY, Kim S, Suga H , Nagamatsu, Hwang I Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in Burkholderis glumae. Mol microbial., v.54(4), p.921-34, 2004.

Kirby AE, King ND, Connell TD. RhuR, an extracytoplasmic function sigma factor activator, is essential for heme-dependent expression of the outer membrane heme and hemoprotein receptor of *Bordetella avium*. Infect Immun., v.72(2), p.896-907, 2004.

Kobenik, R TonB-dependent trans-envelope signaling: the exception or the rule? TRENDS in Microbiology., v.13(8), 2005.

Koster M, van de Vossenberg J, Leong J, Weisbeek PJ. Identification and characterization of the pupB gene encoding an inducible ferric-pseudobactin receptor of Pseudomonas putida WCS358. Mol Microbiol., v.8(3), p.591-601, 1993.

Koster M, van Klompenburg W, Bitter W, Leong J, Weisbeek P. Role for the outer membrane ferric siderophore receptor PupB in signal transduction across the bacterial cell envelope. EMBO J., v.13(12), p.2805-13, 1994.

Kovacikova G, Lin W, Skorupski K. Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/bolfilm formation by the virulence activator AphA and the acetate-responsive LysR-type regulator AlsR in Vibrio cholerae. Mol Microbiol., v.57(2), p.420-33, 2005.

Kustu S, Santero E, Keener J, Popham D, Weiss D. Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. Microbiol Rev., v.(3), p.367-76, 1989.

Kutsukake K, Iino T. Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in Salmonella typhimurium. J Bacteriol, v.12, p.3598-605., 1994

Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A., v.99(10), p.7072-7, 2002.

Lee SW, Jeong KS, Han SW, Lee SE, Phee BK, Hahn TR, Ronald P. The Xanthomonas oryzae pv. oryzae PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, hrpG expression, and virulence. J Bacteriol., v.190(6), p.2183-97, 2008.

Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in Vibrio harveyi and Vibrio cholerae. Cell., v.118(1), p.69-82, 2004.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods., v.25(4), p.402-8, 2001.

Llama-Palacios A, López-Solanilla E, Poza-Carrión C, García-Olmedo F, Rodríguez-Palenzuela P. The *Erwinia chrysanthemi* phoP-phoQ operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. Mol Microbiol. V.49(2), p.347-57, 2003.

Llama-Palacios A, López-Solanilla E, Rodríguez-Palenzuela P. Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of Erwinia chrysanthemi strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid Hh, and regulation of pectolytic enzymes. J Bacteriol., v.187(6), p.2157-62, 2005.

Lonetto M, Gribskov M, Gross CA. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. J Bacteriol Review,v.12, p.3843-9, 1992.

Louvel H, Saint Girons I, Picardeau M. Isolation and characterization of FecA- and FeoB-mediated iron acquisition systems of the spirochete *Leptospira biflexa* by random insertional mutagenesis. J Bacteriol., v.187(9), p.3249-54, 2005.

Mahren S, Enz S, Braun V. Functional interaction of region 4 of the extracytoplasmic function sigma factor FecI with the cytoplasmic portion of the FecR transmembrane protein of the Escherichia coli ferric citrate transport system. J Bacteriol., v.184(13), p.3704-11, 2002.

Marceau M, Sebbane F, Ewann F, Collyn F, Lindner B, Campos MA, Bengoechea JA, Simonet M. The pmrF polymyxin-resistance operon of Yersinia pseudotuberculosis is upregulated by the PhoP-PhoQ two-component system but not by PmrA-PmrB, and is not required for virulence. Microbiology.,v.150(Pt 12), p.3947-57, 2004.

Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, Aller SG, Unger VM. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A., v.99(25), p.16243-8, 2002.

Marshall B, Stintzi A, Gilmour C, Meyer JM, Poole K. . Citrate-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. Microbiology., v.155(Pt 1), 305-15, 2009.

Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. Trends Immunol., v.26(8), p.447-54, 2005. Review.

McCarter LL. Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. Microbiol Mol Biol Rev.,v.65(3), p.445-62, 2001. Review.

McCarter LL. Regulation of flagella. Review. Curr Opin Microbiol.v.9,p180-6, 2006.

Mecsas J, Rouviere PE, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA. The activity of sigma E, an Escherichia coli heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. Genes Dev., v.7(12B), p.2618-28, 1993.

Missiakas D, Betton JM, Raina S. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of Escherichia coli SurA, FkpA and Skp/OmpH. Mol Microbiol., v.4, p.21871-84,1996.

Missiakas D, Mayer MP, Lemaire M, Georgopoulos C, Raina S. Modulation of the Escherichia coli sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. Mol Microbiol., v.24(2), p.355-71, 1997.

Missiakas D, Raina S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation.Mol Microbiol., v.28(6):1059-66, 1998.

Moreira, L.M., De Souza, R.F., Digiampietri, L.A., Da Silva, A.C., Setubal, J.C.Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xilella* complete genomes. OMICS., v.9, p.43-76, 2005.

Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ. *"A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus". *Science*., v.312(5779), p.1526–30, 2006.

Murakami KS, Masuda S, Darst SA. Crystallographic analysis of Thermus aquaticus RNA polymerase holoenzyme and a holoenzyme/promoter DNA complex. Methods Enzymol., v.370, p.42-53, 2003.

Murray e Kazmierczak Pseudomonas aeruginosa exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. J. Bacteriol. V.190, p.2700–2708, 2008.

Naikare H, Palyada K, Panciera R, Marlow D, Stintzi AMajor role for FeoB in Campylobacter jejuni ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. Infect Immun., v.74(10), p.5433-44, 2006.

Neves, M.F., Lopes, F.F., Rossi, R.M., Melo P.A.O. Agroindustry production chain analysis methods as applied to citriculture. Rev. Bras.Frutic., v.26, p.468-473, 2004.

Nguyen RL, Tam LW, Lefebvre PA. The LF1 gene of Chlamydomonas reinhardtii encodes a novel protein required for flagellar length control. Genetics., v.169(3), p.1415-24, 2005.

Padmanabhan, D., Vidyasekaran, P., Rajagopalan, C.K.S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. Indian J. Phytopathol.,v.26, p.215-217, 1973.

Pallen MJ, Penn CW, Chaudhuri RR. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. Trends Microbiol., v.13, p.143-9., 2005.

Palmer J, Flint S, Brooks J Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. J Ind Microbiol Biotechnol., v.34(9), p.577-88, 2007.

Pandey A, Sonti RV Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* on rice. J Bacteriol. , v.192(12), p.3187-203, 2010.

Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. Nucleic Acids Res. v.29(24), p.5195-206, 2001.

Poole K, Neshat S, Krebes K, Heinrichs DE. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene fpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol., v.175(15), p.4597-604, 1993

Pradel E, Locht C. Expression of the putative siderophore receptor gene bfrZ is controlled by the extracytoplasmic-function sigma factor BupI in Bordetella bronchiseptica. J Bacteriol. v.183(9), p.2910-7, 2001.

Preston GM., Studholme DJ., Caldelari I. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. FEMS Microbiol. Rev., v.29, p.331-360, 2005

Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. "Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.**103** (5)., p.1528–33, 2006.

Rahme LG, Mindrinos MN, Panopoulos NJ Plant and environmental sensory signals control the expression of hrp genes in Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. J Bacteriol. v.174(11), p.3499-507, 1992.

Raivio TL, Silhavy TJ. Periplasmic stress and ECF sigma factors. Annu Rev Microbiol. 2001;55:591-624. Review

Raivio TL. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. Mol Microbiol., v.56(5), p.1119-28, 2005. Review.

Regelmann AG, Lesley JA, Mott C, Stokes L, Waldburger CD. Mutational analysis of the Escherichia coli PhoQ sensor kinase: differences with the Salmonella enterica serovar Typhimurium PhoQ protein and in the mechanism of Mg2+ and Ca2+ sensing. J Bacteriol. v.184(19), p.5468-78, 2002.

Robey M, Cianciotto NP Legionella pneumophila feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. Infect Immun., v.70(10), p.5659-69, 2002.

Rong JC, Helmann JD. Genetic and physiological studies of *Bacillus subtilis* sigma A mutants defective in promoter melting. J Bacteriol., v.176(17), p.5218-24, 1994

Ross W, Gosink KK, Salomon J, Igarashi K, Zou C, Ishihama A, Severinov K, Gourse RLA third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase.Science., v.262(5138), p.1407-13, 1993.

Rossetti, V. Citrus Canker in latin América. a review. Proc Inter Soc Citric., v.3, p.918-924, 1977.

Rowley G, Stevenson A, Kormanec J, Roberts M. Effect of inactivation of degS on Salmonella enterica serovar typhimurium in vitro and in vivo. Infect Immun. v.73(1), p.459-63, 2005

Rustam T, McClean S, Newcombe J, McFadden J, Eales-Reynolds LJ. Reduced toxicity of lipo-oligosaccharide from a phoP mutant of Neisseria meningitidis: an in vitro demonstration. J Endotoxin Res., v.12(1), p.39-46, 2006.

Saier MH Jr. Evolution of bacterial type III protein secretion systems. Trends Microbiol. v.12(3), p.113-5, 2004.

Sambrook, R.,Avaiable:http://www.molecularcloning.com/members/protocols.[2001].

Schulte R, Bonas U. Expression of the Xanthomonas campestris pv. vesicatoria hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. J Bacteriol.,v.174(3), p.815-23,.1992.
Sharp MM, Chan CL, Lu CZ, Marr MT, Nechaev S, Merritt EW, Severinov K, Roberts JW, Gross CA. The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. Genes Dev., v.13(22), p.3015-26, 1999.

Stojiljkovic I, Cobeljic M, Hantke K. Escherichia coli K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. FEMS Microbiol Lett., v.108(1), p.111-5, 1993.

Studholme, D.J., Buck, M. The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. FEMS Microbiol. Lett, v.186, p.1-9, 2000.

Swings, J.G., Civerolo, E.L., Xanthomonas. Chapman & Hall, London, 1993.

Syed KA, Beyhan S, Correa N, Queen J, Liu J, Peng F, Satchell KJ, Yildiz F, Klose KE. The Vibrio cholerae flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. J Bacteriol., v.191(21), p.6555-70, 2009.

Tampakaki AP., Fadouloglou VE., Gazi AD., Panopoulos NJ., Kokkinidis M. Conserved features of type III secretion. Cell Microbiol., v.6, p.805-816, 2004.

Tan YP, Zheng J, Tung SL, Rosenshine I, Leung KY. Role of type III secretion in Edwardsiella tarda virulence. Microbiology.,v.151(Pt 7), p.2301-13, 2005

Taylor M, Butler R, Chambers S, Casimiro M, Badii F, Merrick M. The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor sigma N plays a role in promoter recognition. Mol Microbiol., v.22: p.1045-54, 1996.

Terashima H, Kojima S, Homma M. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. Int Rev Cell Mol Biol., v.270, p.39-85, 2008;Review.

Thongboonkerd V, Vanaporn M, Songtawee N, Kanlaya R, Sinchaikul S, Chen ST, Easton A, Chu K, Bancroft GJ, Korbsrisate S. Altered proteome in Burkholderia pseudomallei rpoE operon knockout mutant: insights into mechanisms of rpoE operon in stress tolerance, survival, and virulence. J Proteome Res. v.6(4), p.1334-41, 2007.
Touati D. Iron and oxidative stress in bacteria. Arch Biochem Biophys., v.373(1), p.1-6, 2000. Review

Toulokhonov II, Shulgina I, Hernandez VJ. Binding of the transcription effector ppGpp to Escherichia coli RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. J Biol Chem.,v.2, p.1220-5., 2001.

Trach K, Burbulys D, Strauch M, Wu JJ, Dhillon N, Jonas R, Hanstein C, Kallio P, Perego M, Bird T, et al. Control of the initiation of sporulation in Bacillus subtilis by a phosphorelay. Res Microbiol., v.142(7-8), p.815-23, 1991. Review.

Travers A, Baillie DL, Pedersen S. Effect of DNA conformation on ribosomal RNA synthesis in vitro. Nat New Biol., v.243.,p.161-3, 1973.
van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol., v.44, p.135-62, 2006. Review.

Vanderpool CK, Armstrong SK. The Bordetella bhu locus is required for heme iron utilization. J Bacteriol, v.183(14), p.4278-87. 2001

Vassylyeva MN, Lee J, Sekine SI, Laptenko O, Kuramitsu S, Shibata T, Inoue Y, Borukhov S, Vassylyev DG, Yokoyama S. Purification, crystallization and initial crystallographic analysis of RNA polymerase holoenzyme from *Thermus thermophilus*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., v.58, p.1497-500, 2002

Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ Iron acquisition and virulence in Helicobacter pylori: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. Mol Microbiol., v.37(2), p.274-86, 2000.

Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from Escherichia coli and Pseudomonas. Mol Microbiol., v.45(5), p.1177-90, 2002 Review

Vivier E, Malissen B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. Nat Immunol., v.6(1), p.17-21, 2005.

Voskuil MI, Chambliss GH. The -16 region of Bacillus subtilis and other gram-positive bacterial promoters. Nucleic Acids Res., v.26(15), p.3584-90, 1998.

Vuthoori S, Bowers CW, McCracken A, Dombroski AJ, Hinton DM Domain 1.1 of the sigma(70) subunit of Escherichia coli RNA polymerase modulates the formation of stable polymerase/promoter complexes.J Mol Biol., v.309, p.561-72, 2001.

Watt TF, Vucur M, Baumgarth B, Watt SA, Niehaus K. Low molecular weight plant extract induces metabolic changes and the secretion of extracellular enzymes, but has a negative effect on the expression of the type-III secretion system in Xanthomonas campestris pv. campestris. J Biotechnol., v.140(1-2), p.59-67, 2009.

Wei ZM, Beer SV. hrpL activates Erwinia amylovora hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. J Bacteriol., v.177(21), p.6201-10, 1995.

Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV.Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science., v.257(5066), p.85-8,1992

Wienk HL, Czisch M, de Kruijff B. The structural flexibility of the preferredoxin transit peptide. FEBS Lett., v.453(3), p.318-26, 1999.

Wilderman PJ, Vasil AI, Johnson Z, Wilson MJ, Cunliffe HE, Lamont IL, Vasil ML. Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun.v.69(9), p.5385-94, 2001.

Wilson C, Dombroski AJ. Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by Escherichia coli RNA polymerase. J Mol Biol., v. 267(1), p.60-74, 1997.

Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. Mecchanisms of bacterial pathogenicity Postgrad Med., v.78, p.216-224, 2002. Review

Wosten, M.M. Eubacterial sigma-factor. FEMS Microbiol.Rev., v.22, p.127-150, 1998

Xiao Y, Hutcheson SW. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in Pseudomonas syringae. J Bacteriol., v.176(10), p.3089-91, 1994.

Xiao Y, Lu Y, Heu S, Hutcheson SW. Organization and environmental regulation of the Pseudomonas syringae pv. syringae 61 hrp cluster. J Bacteriol. 1992 Mar;174(6):1734-41.

Yang TC, Leu YW, Chang-Chien HC, Hu RMFlagellar biogenesis of Xanthomonas campestris requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. J Bacteriol.v.191(7), p.2266-75, 2009.

Yoshimochi T, Hikichi Y, Kiba A, Ohnishi K. The global virulence regulator PhcA negatively controls the Ralstonia solanacearum hrp regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signaling proteins. J Bacteriol. v.191(10), p.3424-8, 2009.

Yoshimura, M, Asai K, Sadaie Y, Yoshikawa H. Interaction of Bacillus subtilis extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors.*Microbiology.*, v.50(Pt 3), p.591-9, 2004.

Zaharik ML, Cullen VL, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, Coburn B, Kehres DG, Maguire ME, Fang FC, Finlay BB. The Salmonella enterica serovar typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. Infect Immun.,v.72(9), p.5522-5, 2004.

Zou LF, Wang XP, Xiang Y, Zhang B, Li YR, Xiao YL, Wang JS, Walmsley AR, Chen GY. Elucidation of the hrp clusters of Xanthomonas oryzae pv. oryzicola that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. Appl Environ Microbiol., v.72(9), p.6212-24, 2006.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Maria Claudia Pereda Francischini

Data de nascimento: 18/01/1978

Nacionalidade: Brasileira Naturalidade: São Paulo

Estado civil: casada

Nome em citações bibliográficas: Rosa, M.C.P

Educação

Segundo Grau:

Colégio Objetivo (São Paulo-SP)

Período 1993-1995

Graduação:

Bacharel em Biomedicina

Centro Universitário Lusíadas - UNILUS (Santos - SP)

Com habilitação para atuação nas áreas de Análises Clínicas e Biologia Molecular

Período: 2000-2003

Pós-Graduação:

Doutorado em Bioquímica pela Universidade de São Paulo, Instituto de Química

Departamento de Bioquímica

Título da Tese: Caracterização dos fatores sigma da RNA polimerase do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

Orientador: Prof.Dr.Shaker Chuck Farah

Período: 2004-2010

Ocupação

09/2002 – 12/2003 Aluna de Iniciação Científica, Instituto de Química, USP

Projeto: Identificação de interações entre proteínas relacionadas a fatores sigma em Xanthomonas axonopodis pv citri

Orientação: Prof.Dr.Shaker Chuck Farah

Bolsista FAPESP vigência da bolsa 06/2003-12/2003

07/2004 – 07/2010 Aluna de Doutorado Direto, Instituto de Química, USP

Projeto: Caracterização dos fatores sigma da RNA polimerase do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri

Orientação: Prof.Dr.Shaker Chuck Farah

Bosista CAPES vigência da Bolsa 08/2004-05/2005/FAPESP vigência da Bolsa 06/2005-08/2009

Publicações

Resumos publicados em anais de congresso

DOCENA, C. ; ALEGRIA, M. C. ; M. C. P. ROSA ; KHATER, L. ; RAMOS, C. H. I. ; SILVA, A. C. R. ; FARAH, S. C. . Identifing Protein-Protein Interactions in Xanthomonas axonopodis pv citri. In: XXXII Reunião Anual de SBBq, 2003, Caxambu - MG. Resumos da XXXII Reunião Anual de SBBq, 2003.

M. C. P. Rosa ; FARAH, S. C. . Analyses of protein-protein interactions involving Xanthomonas axonopodis pv citri RNA polimerase sigma factors. . In: XXXIV Reunião Anual de SBBq, 2005. Resumos da XXXIV Reunião Anual de SBBq.

Rosa, M. C. P. ; FARAH, S. C. . Analysis of Protein-Protein Interactions Involving RNA Polymerase Sigma Factors of Xanthomonas axonopodis pv citri. In: XXXV Reunião Anual de SBBq, 2006, águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos, 2006

Rosa, M. C. P. ; FARAH, S. C. . Investigating the Signal Transduction and Gene Expression Networks Responsible for the Expression of the Type III Secretion System in Xanthomonas axonopodis pv. citri. In: XXXVI Reunião Anual de SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador, BA. Livro de Resumos, 2007.

DOCENA, C. ; ALEGRIA, M. C. ; CAPPELLETTI, P. A. ; Rosa, M. C. P. ; FARAH, S. C. . Identifying Protein-Protein Interactions of Two-Component Systems of the Phythopathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri. In: XXXVI Reunião Anual de SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador, BA. Livro de Resumos, 2007.

Artigo completo

Andrade MO, Alegria MC, Guzzo CR, Docena C, Rosa MC, Ramos CH, Farah CS. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen Xanthomonas axonopodis pv citri. Mol Microbiol., v.62(2), p.537-51, 2006.