UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MAXUEL DE OLIVEIRA ANDRADE

Estudo da sinalização celular envolvendo a via do *quorum-sensing* e os segundos mensageiros c-diGMP e (p)ppGpp no fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv citri.

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo
30/08/2011

MAXUEL DE OLIVEIRA ANDRADE

Estudo da sinalização celular envolvendo a via do *quorum-sensing* e os segundos mensageiros c-diGMP e (p)ppGpp no 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
30/08/2011

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre me deu forças para superar as dificuldades e em especial à minha mãe que lutou ao meu lado desde o ensino médio até a finalização dos trabalhos deste doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Shaker Chuck Farah pela confiança, sugestões, que me ajudaram a crescer como pesquisador, e apoio para conseguir realizar este projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Max Dow e Dr. Robert Ryan (University College of Cork, Irlanda) por ter me recebido gentilmente em seu laboratório e ter dado todo o auxílio para a realização dos experimentos com os mutantes de *Xanthomonas axonopodis* pv citri.

Ao Dr. Cleber Wanderlei Liria pela amizade e grande apoio para a finalização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Celso Benedetti, Dr. Frederico Gueiros, Dra. Regina Baldini, Dra. Rita Café, Dra. Marilis do Valle Marques, Dra. Suely Gomes e Dra. Aline Maria da Silva pelas discussões científicas e trocas de conhecimentos sobre novas metodologias aplicadas ao estudo de bactérias e na interação planta-patógeno.

À Professora Dra. Elizabeth Fontes por ter me apresentado e incentivado a seguir no caminho da pesquisa científica.

Aos colegas cientistas Dr. José Freire da Silva Neto, Dr. Rogério Ferreira Lourenço, Dr. Reginaldo Buzeli, Ms. Alexandre Bisson, Ms. Gianluca e Ms. Ana Laura pelas discussões científicas e disposição sempre em ajudar com plasmídeo, microscópio e novos protocolos de biologia molecular.

Aos meus amigos Francisco, Claudinei, Rui, Gerson, Rogério, Débora e Glênio pelo companheirismo durante estes sete anos que moro em São Paulo.

Aos amigos do laboratório: Ângela, Camila, Cláudia, Cristiane, Cristina, Diorge, Fernando, Ilda, Maycom, Paola, Priscila, Rafael e Ronaldo pelas discussões científicas e conversas filosóficas no horário do café.

Aos amigos do laboratório de Fitoquímica e Fisiologia Vegetal do departamento de Botânica-USP pela amizade e apoio durante a escrita deste trabalho.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil (CNPq) também pelo auxílio financeiro.

**Between stimulus and response there is a space.
In that space is our power to choose our response.
In our response lies our growth and our freedom.**

Victor E. Frankl, 1985.

RESUMO

Andrade, M.O. **Estudo da sinalização celular envolvendo a via do *quorum-sensing* e os segundos mensageiros c-diGMP e (p)ppGpp no fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv *citri***. 2011. 237p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (XAC) é o agente causal do cancro em citros. O desenvolvimento da infecção depende do sucesso de XAC na colonização do hospedeiro. Para isso, além do sistema de secreção tipo III, que injeta efetores de virulência dentro da célula do hospedeiro, *Xanthomonas* também conta com o processo de *quorum-sensing*. O aumento da densidade celular em XCC (*Xanthomonas campestris* pv *campestris*) promove o acúmulo da molécula sinalizadora difusível (DSF) produzida por RpfF, que ativa o sistema de dois componentes formado pelas proteínas RpfC e RpfG, as quais transduzem o sinal de ativação para o fator de transcrição Clp (CAP Like Protein - homóloga da proteína CAP de *E. coli*). A proteína RpfG contém um domínio de fosfodiesterase conservado (HD-GYP) que regula a concentração de diGMP cíclico (c-diGMP), um segundo mensageiro bacteriano. Dessa forma o domínio HD-GYP atua contrapondo-se à atividade dos domínios diguanilato ciclases (GGDEF). No caso de XCC, foi demonstrado que a ativação do domínio HD-GYP de RpfG reduz a concentração de c-diGMP na célula e promove a ligação e ação positiva de Clp no promotor do gene de *engXCA*. Com intuito de estudar a via Rpf em XAC, produzimos mutantes não-polares de *rpfF*, *rpfC*, *rpfG*, dos genes que codificam os domínios GGDEF que interagiram com RpfG (Andrade et al. 2006), *clp*, *fliC*, *piT*, *gumD* e também geramos mutantes dos operons *xcs* e *xps*, que codificam sistemas de secreção do tipo 2 em XAC. Análise por HPLC-MS/MS mostrou que a deleção de *rpfG*, mas não *clp*, promoveu um aumento de aproximadamente 4 vezes dos níveis celulares de c-diGMP. Também foi demonstrado por EMSA que c-diGMP inibe a ligação de Clp ao promotor do operon *xcs*. Os mutantes $\Delta rpfF$ -C-G e Δclp mostraram um comprometimento da mobilidade, redução da biossíntese de exopolissacarídeos e na produção de fatores de virulência. Outrossim, observamos uma diminuição significativa no crescimento dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp dentro do hospedeiro. Além disso, identificamos também novos fatores envolvidos no metabolismo do c-diGMP e (p)ppGpp em XAC. Além do c-diGMP, outro segundo mensageiro o (p)ppGpp, cuja concentração na célula é regulada pelas proteínas SpoT e RelA, pode afetar a expressão de maneira dependente da subunidade ω da RNA polimerase em XAC. Finalmente, propusemos um modelo onde a concentração de c-diGMP sob controle da via do *quorum-sensing* e a sinalização por (p)ppGpp podem convergir para alguns efetores que regulam a mobilidade e a patogenicidade em XAC.

Palavras-chave: *quorum-sensing*, c-diGMP, (p)ppGpp, mobilidade, fatores de virulência e *Xanthomonas*.

ABSTRACT

Andrade, M.O. **Study of cell signaling pathways involving quorum-sensing and the second messengers c-diGMP and (p)ppGpp in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.** 2011. 237p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In *Xanthomonas*, the cell-cell signaling mediated by diffusible molecules is known to play an important role in regulating physiological process, including the formation and dispersal of biofilms and virulence. It has been shown that the ability of *Xanthomonas* species to incite disease depends on several factors, including adhesins, synthesis of extracellular enzymes, type III secretion system (T3SS) effectors and the exopolysaccharide (EPS) xanthan. The *rpf* genes act to positively regulate the synthesis of extracellular enzymes, EPS and pathogenicity. The *rpfF*, *rpfC* and *rpfG* genes are implicated in a regulatory system involving a diffusible signal factor (DSF) whose synthesis of DSF depends on RpfF. DSF perception and signal transduction are mediated by the two-component system comprising RpfC and RpfG. High cell densities are thought to lead to the phosphorylation of RpfG by RpfC which in turn activates the RpfG HD-GYP phosphodiesterase domain whose substrate has been shown to be the important second messenger cyclic diGMP (c-diGMP) (Ryan et al., 2006). This work was prompted to by the observation that the HD-GYP domain of RpfG interacts with a subset of diguanylate cyclase (GGDEF) proteins (Andrade et al., 2006), responsible for c-diGMP synthesis in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (XAC). In order to study *rpf* signaling in XAC, we produced non-polar knockouts of *rpfF*, *rpfC*, *rpfG*, all genes coding the GGDEF domains shown to interact with RpfG, CAP-like protein (*clp*), *fliC*, *pilT*, *gumD* and polar insertions in the operons of both type 2 secretion systems coded by the XAC genome. HPLC-MS/MS analysis showed that the deletion of *rpfG*, but not *clp*, promoted an approximate 4-fold increase in cellular c-diGMP levels. We Also demonstrated that c-diGMP inhibits the binding of Clp to the promoter of the XAC0694 gene, the first gene in the operon coding the type 2 secretion system. The *rpf* genes and *clp* knockouts have impaired motility, reduction in exopolysaccharides and extracellular enzyme production. Furthermore, we observe a significant decrease in the growth of *rpfG* and *clp* mutants in host tissues. Our results demonstrate that RpfF-RpfC-RpfG-Clp signaling in XAC is associated with cellular c-diGMP levels and is important for XAC virulence, motility, and EPS production. In addition, we have identified new factors involved to metabolism of c-diGMP and (p)ppGpp in XAC. The (p)ppGpp synthesis and degradation is under control of the proteins SpoT and RelA; However the effect of (p)ppGpp on gene expression seems to depend of the ω subunit of RNA polymerase in XAC. Finally, we propose the model where c-diGMP levels controlled by quorum-sensing and the (p)ppGpp signalization may converge to regulate the motility and pathogenicity of XAC.

Keywords: quorum-sensing, c-diGMP, (p)ppGpp, motility, virulence factors and *Xanthomonas*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

XAC - *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

XCC - *Xanthomonas campestris* pv *campestris*

XOO - *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*

XCV - *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*

dNTP - desoxirribonucleotídeos

DNA - ácido desoxirribonucléico

RNA - ácido ribonucléico

Δ - representa a deleção de um determinado gene

LPS - lipopolissacarídeo

EPS - exopolissacarídeo

PT4 - pilus tipo 4

SST2 - sistema de secreção tipo 2

SST3 - sistema de secreção tipo 3

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1.O fitopatógeno <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv citri e o cancro cítrico.....	13
1.2.Os fatores associados à virulência de <i>Xanthomonas spp</i>	15
1.2.1.Sistemas de secreção associados com a virulência de <i>Xanthomonas spp</i>	16
1.2.2.Estruturas localizadas na superfície da célula de <i>Xanthomonas spp</i> envolvidas com a virulência.....	20
1.3.Comunicação célula-célula (<i>Quorum-sensing</i>) em bactérias.....	24
1.4.Sinalização via sistema de dois componentes.....	26
1.5.O sistema <i>rpf</i> (fatores reguladores da patogenicidade) controla a via de <i>quorum-sensing</i> em <i>Xanthomonas spp</i>	27
1.6.Domínios GGDEF, EAL e HD-GYP - reguladores da concentração de diGMP cíclico em bactérias.....	31
1.7.Proteínas GGDEF, EAL e HD-GYP de XAC.....	34
1.8.Os receptores para c-diGMP regulam diferentes processos na célula bacteriana.....	38
1.9.Controle pós-transcricional pelo regulador do metabolismo de carbono (CsrA) e seu controle indireto sobre o metabolismo de c-diGMP.....	40
1.10.Atuação do alormônio (p)ppGpp na expressão gênica e regulação da virulência em bactérias.....	42
2. Objetivos.....	47
3. Materiais e Métodos	48
3.1.Construção dos mutantes não polares utilizando o vetor suicida pNPTS138.....	48
3.2.Preparação e transformação de células competentes de XAC e XCC.....	55
3.3.Produção dos mutantes não polares.....	56
3.4.Clonagem dos genes de XAC no vetor PUFR047 para complementação dos nocautes.....	58
3.5.Expressão induzida e constitutiva de genes de XAC utilizando os vetores pBRA e pMR20.....	60
3.6.Ensaio de mobilidade.....	63
3.7.Microscopia eletrônica de transmissão das células de XAC.....	64
3.8.Purificação e quantificação da goma xantana no sobrenadante de XAC.....	64
3.9.Análise da expressão do operon <i>gum</i> por meio da atividade de GUS.....	65
3.10.Ensaio de produção de endoglucanases no sobrenadante de XAC.....	66
3.11.Ensaio de produção de proteases extracelulares por XAC.....	67
3.12.Quantificação de c-diGMP nas células de XAC por HPLC-MS/MS.....	67
3.13.Teste de patogenicidade e curva de crescimento das cepas de XAC em laranja pêra.....	69
3.14.Ensaio de interação proteína-proteína com o sistema de dois híbridos.....	70
3.15.Análise de interações do domínio HD-GYP com presas GGDEF em levedura.....	74
3.16.Ensaio com sistema de dois híbridos para confirmar a interação entre XAC3402 e o domínio EAL de XAC1938.....	75
3.17.Clonagem e expressão heteróloga das proteínas recombinantes XAC0424, XAC0483 (<i>clp</i>), XAC1185, XAC1743 (<i>csrA</i>) e XAC1971.....	76
3.18.Purificação da proteína recombinante 6HisXAC0424 e análise da sua atividade diguanilato ciclase.....	78
3.19.Expressão heteróloga e purificação de 6HisSumoClp(XAC0483).....	79

3.20. Ensaio para verificar mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) na interação de Clp com promotor do SST2 <i>xcsC</i>	79
3.21. Crescimento de XAC em meio mínimo com inibidor da via de síntese de histidina.....	80
3.22. Análise do acúmulo de (p)ppGpp em células de XAC por cromatografia de camada delgada (CCD).....	81
3.23. Mutação sítio dirigida nos genes de XAC1971 (<i>PilZ</i>) e XAC1185 (homólogo de <i>SpoT_{HD}</i>).....	82
3.24. Expressão e purificação de 6HisCsrA (XAC1773), 6HisXAC1185 E 6HisSumoXAC1971 em <i>E. coli</i>	82
3.25. Extração de RNA das células de XAC.....	83
3.26. Determinação do início da transcrição do gene <i>cmf</i> (XAC0330) por ensaio do ensaio de extensão de oligonucleotídeo (<i>Primer extension</i>).....	84

4. RESULTADOS86

4.1. Análise geral dos fenótipos das cepas mutantes produzidas neste projeto de pesquisa.....	86
4.1.1. Estudos da mobilidade dos nocautes de XAC nos meios semi-sólidos Eiken e SB.....	91
4.1.2. Complementação dos nocautes <i>hfq</i> e <i>ptsK</i>	95
4.1.3. A super expressão de <i>rpfG</i> suprime a perda de mobilidade nas cepas Δ XAC2975 e Δ <i>hfq</i>	97
4.1.4. Análise da produção de endoglucanases nos nocautes.....	98
4.1.5. Análise da produção de proteases extracelulares nos nocautes de XAC.....	100
4.1.6. Teste de patogenicidade dos mutantes na planta hospedeira	101
4.1.7. Determinação do início da transcrição de XAC0330 (<i>cmf</i>) por ensaio de extensão de oligonucleotídeo (<i>Primer extension</i>).....	102
4.2. Comunicação celular e sinalização por diGMP cíclico: Sistema <i>rpf</i>, diguanilato ciclases (GGDEF) e fosfodiesterases (HD-GYP e EAL).....	105
4.2.1. Análise de interações do domínio HD-GYP de RpfG com domíniosGGDEF de <i>Xanthomonas</i> em levedura.....	105
4.2.2. Ensaio de dois híbridos com a diguanilato ciclase XAC0424.....	107
4.2.3. Ensaio para verificar a produção c-diGMP por 6HisXAC0424.....	108
4.2.4. Os mutantes <i>rpf</i> promovem o aparecimento dos fenótipos de rugosidade na colônia e agregação celular em XAC.....	111
4.2.5. Super expressão do gene XAC0424 (Diguanilato ciclase) promove o aparecimento de rugosidade na colônia e agregação celular em XAC.....	113
4.2.6. Análise da mobilidade em meio semi sólido dos mutantes para via <i>rpf</i> e diguanilato ciclases que interagiram com RpfG de XAC.....	115
4.2.7. Quantificação de c-diGMP nos mutantes Δ <i>rpfG</i> e Δ <i>clp</i> de XAC.....	119
4.2.8. Diferenças observadas entre as mobilidades de XAC e XCC.....	121
4.2.9. Microscopia eletrônica de transmissão dos mutantes de XAC.....	125
4.2.10. Produção de goma xantana nos nocautes com a mobilidade alterada: Δ <i>rpfG</i> e Δ <i>piT</i>	126
4.2.11. Expressão do promotor <i>gum</i> nos nocautes com mobilidade alterada.....	127
4.2.12. Análise da produção de endoglucanases nos mutantes envolvidos com a via de <i>quorum-sensing</i> em XAC.....	129
4.2.13. Análise da produção de proteases extracelulares nos mutantes envolvidos com via de <i>quorum-sensing</i> em XAC.....	131
4.2.14. Redução do crescimento dos mutantes Δ <i>rpfG</i> e Δ <i>clp</i> no hospedeiro.....	134

4.2.15. Ensaio de EMSA com o promotor do operon <i>xcs</i> e Clp recombinante.....	136
4.2.16. Análise da presença de fatores de virulência no sobrenadante e Patogenicidade dos nocautes para os sistemas de secreção tipo II (<i>xcs</i> e <i>xps</i>).....	138
4.3. Sistema de sinalização por c-diGMP: proteínas PilZ funcionam como receptores para diGMP cíclico em XAC.....	140
4.3.1. Ensaio de dois híbridos com os homólogos de PilZ de XAC.....	140
4.3.2. Proteínas com domínio PilZ atuam regulando a mobilidade em XAC.....	143
4.3.3. A deleção de <i>XAC1971_{PilZ}</i> no mutante $\Delta rpfF$ reduz a agregação celular.....	146
4.3.4. Análise genética mostra que <i>XAC1971</i> pode interagir com c-diGMP.....	148
4.3.6. Expressão heteróloga e purificação de <i>XAC1971_{PilZ}</i>	150
4.4. Sinalização por c-diGMP e o regulador pós-transcricional CsrA em XAC.....	153
4.4.1. O mutante $\Delta csrA$ de XAC forma agregados celulares.....	152
4.4.2. A deleção de <i>csrA</i> reduz a mobilidade e a produção de exopolissacarídeos em XAC.....	153
4.4.3. A mobilidade de $\Delta csrA$ é restaurada com a super-expressão de fosfodiesterases.....	155
4.4.4. Determinação da concentração de c-diGMP em $\Delta csrA$	156
4.4.5. CsrA é essencial para a virulência de XAC.....	157
4.4.6. CsrA regula positivamente a produção de endoglucanases.....	158
4.4.7. Expressão da proteína recombinante 6HisCsrA (<i>XAC1743</i>) em <i>E coli</i> e sua purificação.....	160
4.5. Sobreposição das vias de sinalização por c-diGMP e (p)ppGpp em XAC.....	162
4.5.1. Obtenção do mutante <i>rpoZ</i> de XAC.....	162
4.5.2. <i>rpoZ</i> ativa a mobilidade e produção de exopolissacarídeos, e reprime a agregação celular em XAC.....	164
4.5.3. Os fenótipos de mobilidade e agregação celular de $\Delta rpoZ$ são suprimidos pela super-expressão de <i>rpfG</i>	167
4.5.4. A deleção de <i>rpoZ</i> promove o aumento de c-diGMP na célula de XAC.....	169
4.5.5. <i>rpoZ</i> é essencial para o crescimento de XAC no hospedeiro.....	171
4.5.6. <i>rpoZ</i> regula positivamente a produção de enzimas extracelulares em XAC.....	172
4.5.6. Acúmulo reduzido de (p)ppGpp no mutante $\Delta rpoZ$ em condições de estresse.....	174
4.5.7. A síntese de histidina é regulada positivamente por <i>rpoZ</i> em XAC.....	176
4.5.8. A atividade de fosfohidrolase de <i>XAC1185</i> , um parálogo do domínio HD de SpoT, é inibida por <i>rpoZ</i> em XAC.....	177
5. DISCUSSÃO.....	182
5.1. Identificação de novos reguladores da mobilidade e virulência em <i>Xanthomonas axonopodis pv citri</i>.....	182
5.1.1. Mutantes com fenótipos de mobilidade alterados em meio semi-sólido.....	183
5.1.2. Alteração da produção de fatores de virulência: Endoglucanases.....	185
5.1.3. Alteração da produção dos fatores de virulência: Proteases extracelulares.....	187
5.1.4. Alteração da patogenicidade.....	187
5.2. Fatores envolvidos na comunicação celular regulam a concentração de c-diGMP, mobilidade e virulência em XAC.....	188
5.2.1. Interação do domínio HD-GYP de RpfG com proteínas GGDEF: Uma nova função regulatória para HD-GYP independente da sua atividade de fosfodiesterase....	188

5.2.2. Mutantes Δrpf FCG apresentam fenótipos de rugosidade da colônia e agregação celular.....	191
5.2.3. A mobilidade de XAC em meio SB semi-sólido é regulada por uma rede complexa de sinais envolvendo o sistema Rpf, Clp, diguanilato ciclasas e fosfodiesterases.....	193
5.2.4. O papel da goma xantana na mobilidade dos mutantes no meio SB.....	196
5.2.5. A via de sinalização Rpf é essencial para produção de fatores de virulência em XAC.....	197
5.2.6. A deleção de <i>rpfG</i> promove um aumento da concentração de c-diGMP nas células de XAC.....	199
5.2.7. A via de sinalização Rpf aumenta a afinidade de Clp pelo promotor do operon <i>xcs</i> de XAC.....	201
5.2.8. RpfG e Clp aumentam a sobrevivência de XAC dentro do hospedeiro.....	204
5.3. <i>XAC1971_{PilZ} responde ao aumento da concentração de c-diGMP e promove a redução da mobilidade e o aumento da agregação celular em XAC.</i>	205
5.4. <i>O regulador pós-transcricional CsrA atua em paralelo ao sistema Rpf controlando a concentração de c-diGMP, mobilidade e virulência em XAC.</i>	212
5.5. <i>Investigando uma possível sobreposição das vias de sinalização por c-diGMP e (p)ppGpp em XAC.</i>	215
6. CONCLUSÕES.....	220
7. REFERÊNCIAS.....	222

ANEXO

1. Introdução

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

O gênero *Xanthomonas* compreende um importante grupo de bactérias Gram-negativas fitopatogênicas, pertencentes à subdivisão Gamma das Proteobactérias. Em geral as espécies de *Xanthomonas* possuem morfologia de bastonete medindo entre 0,2 e 0,6 μm de diâmetro e 0,8 a 2,9 μm de comprimento com um flagelo polar (monotriquia) (Graham *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005), são aeróbicas obrigatórias e têm uma temperatura ótima de crescimento entre 25-30 $^{\circ}\text{C}$ (Brunings and Gabriel, 2003). A colônia bacteriana apresenta uma cor amarelada devido à produção do pigmento xanthomonadina ligado à membrana celular e aspecto mucóide em função da produção de exopolissacarídeos, principalmente a goma xantana (Brunings and Gabriel, 2003; Graham *et al.*, 2004; Dunger *et al.*, 2007b) (Figura 1). Membros do gênero *Xanthomonas* infectam aproximadamente 124 monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas, sendo que a maioria destas plantas representa grande importância econômica nas regiões com climas quentes e úmidos (Graham *et al.*, 2004; Chan and Goodwin, 1999).

Figura 1. **A)** Foto de placa com estrias e colônias de *Xanthomonas* crescendo em meio ágar. **B)** Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a morfologia de bastonete e o flagelo polar de *Xanthomonas* Cortesia do Dr. E.W. Kitajima, MEPA-ESALQ-USP. **C)** Microscopia eletrônica mostrando *Xanthomonas* na abertura de um estômato da folha de laranjeira (Graham *et al.*, 2004). **D)** Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a colonização de *Xanthomonas* no espaço intercelular do hospedeiro (Boch and Bonas, 2010).

Entre as diversas doenças ocasionadas por *Xanthomonas spp* tem-se o cancro cítrico, cujo agente causal é *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (XAC). O fitopatógeno penetra no hospedeiro através de aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas ou por ferimentos (Gottwald *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2004). Ao atingir o espaço mesofílico da planta, a bactéria multiplica-se nos espaços intercelulares promovendo o desenvolvimento da patologia, caracterizada pelos estágios de: 1) Encharcamento do tecido (“water-soaking”), 2) hipertrofia celular, 3) hiperplasia do tecido infectado e 4) clorose e necrose da região colonizada pela bactéria. Pequenas manchas amarelas salientes são formadas durante o desenvolvimento da doença devido à redução da produção e degradação das clorofilas, carotenos e xantofilas do hospedeiro. Nos estágios mais avançados da doença as lesões se tornam escuras e corticosas, podendo ser facilmente rompidas, permitindo a disseminação da bactéria (Graham *et al.*, 2004; Verniere *et al.*, 2003) (Figura 2). As lesões formadas no cancro cítrico são semelhantes a verrugas e podem se formar em folhas, ramos e frutos, ocasionando a abscisão prematura de folhas e frutos e comprometendo a produtividade da planta (Brunings and Gabriel, 2003).

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

Nenhuma das variedades e espécies de citros é imune ao cancro cítrico, sendo alguma delas mais resistentes (em ordem decrescente: tangerina, mexerica do rio, limão Tahiti, laranja pêra, laranja valência, limão cravo, laranja Hamlin, limão siciliano, limão galego e pomelo) (<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>). O homem é o principal responsável pela disseminação do cancro cítrico, promovendo a dispersão das bactérias de um lugar para outro, através dos materiais empregados na colheita, veículos e máquinas, ou mesmo por meio do transporte de mudas contaminadas, folhas, ramos e frutos. Na natureza a bactéria também pode ser disseminada pelo vento, quando associado com chuvas, além da larva minadora de citros, *Phyllocnistis citrella* que ao formar galerias nas folhas, facilita a penetração e desenvolvimento da bactéria no hospedeiro, caracterizando uma disseminação de curta distância (<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>).

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 forma atual de eliminar o cancro cítrico é a erradicação das plantas contaminadas. Por essa razão na citricultura as medidas preventivas em conjunto com a inspeção rotineira do pomar são necessárias para garantir a produção de frutos com boa qualidade e evitar a disseminação rápida de XAC (Graham *et al.*, 2004).

1.2. Os fatores associados à virulência de *Xanthomonas spp*

Os mecanismos de interação das plantas com seus patógenos podem ser caracterizados genericamente como uma troca de sinais que envolvem um sistema de “ataque e defesa com o contra ataque”. De um lado, a planta tenta desativar o sistema de ataque do invasor e do outro, o patógeno tenta contrapor ao sistema de defesa da planta para sobreviver (Stahl and Bishop, 2000).

Para se estabelecer no hospedeiro as bactérias fitopatogênicas devem ser capaz de aderir na superfície da planta, invadir o espaço intercelular do hospedeiro e sobrepor às

respostas de defesa da planta. Para garantir a sua sobrevivência no hospedeiro, as bactérias fitopatogênicas contam com um arsenal de fatores de virulência.

1.2.1. Sistemas de secreção associados com a virulência de *Xanthomonas spp*

O sucesso na infecção dos fitopatógenos bacterianos muitas vezes depende dos sistemas de secreção para transportar proteínas para o espaço extracelular ou o transporte de proteínas ou DNA diretamente para dentro do citoplasma da célula do hospedeiro, processo este denominado translocação (Buttner and Bonas, 2002). Em bactérias há seis sistemas principais de secreção, tipo I- II- III- IV- V e VI, com estratégias distintas para efetuar o transporte de proteínas através da membrana citoplasmática (Buttner and Bonas, 2002; Tseng *et al.*, 2009). As características destes sistemas de secreção estão resumidas na Figura 3.

Figura 3. Principais vias de secreção em bactérias Gram-negativas são denominadas sistemas de secreção do tipo I, II, III, IV, V e VI. Os sistemas de secreção do tipo II e V dependem do sistema complementar Sec, que fornece energia para a translocação de substratos através das membranas interna e externa da célula bacteriana. Os sistemas I, III, IV e VI possuem subunidades com atividade ATPásica em sua base que produzem energia para o transporte de diversos fatores através das membranas interna e externa. Os sistemas III, IV e VI transportam fatores de virulência para dentro da célula do hospedeiro. IM, membrana interna; OM, membrana externa; HM, membrana citoplasmática do hospedeiro (Tseng *et al.*, 2009).

O sistema de secreção do tipo I (SST1) promove o transporte de proteínas através das membranas bacterianas, sendo formado por três proteínas secretoras: uma localizada na membrana interna, o ABC transportador (*ATP-binding cassette*), com função de fornecer energia para a secreção a partir da hidrólise do ATP; outra na membrana externa; e a terceira ancorada no espaço periplasmático, formando um canal entre as duas anteriores. Em algumas bactérias esse sistema é responsável pela secreção de toxinas, proteases e lipases, conferindo resistência a determinados compostos tóxicos produzidos pela planta, além de liberar no espaço extracelular proteínas que participam do processo de patogenicidade (por exemplo, alfa-hemolisina em *Escherichia coli*, adenilato ciclase em *Bordetella pertussis* e proteases em *Pseudomonas aeruginosa* e *Erwinia chrysanthemi*) (Linton and Higgins, 1998; Binet *et al.*, 1997; Delepelaire, 2004). Estudos realizados em *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (XOO) mostram que o SST1 é requerido para secretar o fator AvrXa21, que é um fator envolvido com a comunicação célula-célula em XOO e também é importante para eliciar uma resposta de defesa em arroz (Shen and Ronald, 2002).

Considerado o principal sistema de secreção de proteínas do periplasma para o espaço extracelular, o sistema de secreção do tipo II (SST2) é encontrado universalmente em eubactérias. O aparato de secreção tipo II consiste de 12-15 componentes, a maioria dos quais se encontram associados com a membrana interna da célula bacteriana (Cianciotto, 2009; Ge and He, 2008; Chen *et al.*, 2005; Russel, 1998). Este sistema promove a secreção de toxinas e enzimas extracelulares como proteases, lipases e enzimas que degradam a parede celular das plantas, contribuindo para a interação entre patógeno e o hospedeiro. Um canal secretório é formado através do periplasma, atravessando a membrana externa por meio da formação de um poro no qual o substrato é secretado para meio externo. Em fitopatógenos, as enzimas secretadas pelo SST2, além de contribuírem para a degradação da parede celular da planta, também podem facilitar a montagem dos aparatos de secreção tipo III e tipo IV, os quais são

essenciais para translocação de efetores para dentro da célula do hospedeiro. A análise do genoma de *Xanthomonas campestris pv campestris*, *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* e *Xanthomonas axonopodis pv citri* revelou a existência de dois *loci* que codificam para a maquinaria do SST2, chamados de *xcs* e *xps*. O locus *xps* codifica o principal SST2 envolvido na virulência de *Xanthomonas*, promovendo a secreção de enzimas degradativas como proteases, endoglucanases, lipases, xilanases e poligalacturonase que são importantes para o desenvolvimento da doença e crescimento da bactéria no hospedeiro (Szczesny *et al.*; Rajeshwari *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2004; Ge and He, 2008; Buttner and Bonas; Szczesny *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2011). No entanto, Szczesny *et al.* (2010) demonstrou que proteínas parálogas codificadas por *xcs* e *xps* podem compensar a perda de componentes homólogos no aparato de secreção tipo II em *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*.

O sistema de secreção do tipo III (SST3) está envolvido com a secreção de fatores de virulência na maioria das bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas e animais (Abe, 2009; Arnold *et al.*; Coburn *et al.*, 2007; Hueck, 1998). Esta é a principal estratégia usada pelo fitopatógeno para translocar efetores de virulência para dentro do citoplasma da célula do hospedeiro (Tang *et al.*, 2006). Nas bactérias fitopatogênicas o SST3 é codificado por um *locus* frequentemente denominado *hrp* (*Hypersensitive Response and Pathogenicity*- induzem resposta de hipersensibilidade em plantas resistentes), o qual consiste de mais de 20 genes organizados em várias unidades de transcrição (Buttner and Bonas, 2002). Estudos em *Xanthomonas*, inclusive em XAC, demonstram que cepas carregando deleções em genes *hrp* ou em seus efetores (proteínas que são translocadas até a célula do hospedeiro) perdem a capacidade de elicitar resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras e patogenicidade nos hospedeiros. Portanto, o SST3 e seus efetores de virulência são essenciais para bloquear as respostas de defesa e promover a sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Buttner and Bonas, 2002; Kay and Bonas, 2009; Gurlebeck *et al.*, 2006; Furutani *et al.*, 2009;

Bonas, 1994; Buttner and Bonas, 2009; Laia *et al.*, 2009; Cappelletti *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2010). Em XAC o efector denominado PthA, pertencente à família de ativadores de transcrição AvrBS3/PthA, quando translocado para dentro da célula do hospedeiro aumenta a expressão de genes envolvidos na síntese e transporte de auxinas e giberelinas (Buttner and Bonas, 2002; Cernadas *et al.*, 2008; Boch and Bonas, 2010; Domingues *et al.*, 2010). O aumento da concentração desses hormônios parece ser importante para ativar o ciclo celular e remodelar a parede da célula vegetal, ocasionando a hipertrofia e hiperplasia no local da infecção.

O aparato de secreção do tipo IV (SST4) também é um sistema protéico formado por múltiplas subunidades que se estendem pelas duas membranas bacterianas. O SST4 pode exportar toxinas e complexos DNA - proteínas, que são levados diretamente para o citoplasma da célula do hospedeiro (Fronzes *et al.*, 2009; Gomis-Ruth *et al.*, 2004; Llosa *et al.*, 2009; Wallden *et al.*, 2010). Em *Agrobacterium tumefaciens* o sistema Vir estabelece um canal de ligação entre a bactéria e a planta, por onde é translocado o T-DNA, o qual após ser integrado no genoma do hospedeiro modifica o metabolismo da célula hospedeira ocasionando o aparecimento do tumor (Vergunst *et al.*, 2005). *Xanthomonas* possui dois *loci* codificando proteínas que formam o SST4, um no plasmídeo e outro no cromossomo (Alegria *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2004). No entanto ainda não foi determinada a função deste sistema na virulência de *Xanthomonas*.

Em relação ao sistema de secreção do tipo V (SST5) sabe-se que ele está inserido na membrana externa bacteriana e que o sinal de transporte pela membrana externa está presente na própria proteína transportada. Por isso, este sistema também é denominado de autotransportador (Lawrenz *et al.*, 2009; Kajava and Steven, 2006). Exemplos de fatores associados à virulência em *Xanthomonas* que são secretados por meio do SST5 são a adesina fimbrial XadA e uma não fimbrial homóloga à hemaglutinina (FhaB) (Das *et al.*, 2009; Buttner and Bonas, 2009). O SST5, assim como o SST2, é dependente do sistema Sec,

localizado na membrana citoplasmática, que fornece energia para o aparato de secreção. Em XAC o homólogo da hemaglutinina FhaB desempenha uma função importante na adesão ao tecido do hospedeiro, sendo que o mutante carregando a deleção do gene *fhaB* apresentou redução na patogenicidade (Gottig *et al.*, 2009).

O sistema de secreção do tipo VI (SST6) está presente em várias espécies de bactérias patogênicas Gram-negativas, sendo constituído por 15-20 proteínas, cujas funções bioquímicas ainda não estão bem caracterizadas (Leiman *et al.*, 2009). Apesar de poucos efetores terem sido caracterizados, alguns de seus componentes pertencentes à família de proteínas VgrGs possuem um domínio de estrutura similar ao usado pelo bacteriófago T4 para perfurar a membrana celular, e promover a entrada do DNA viral no citoplasma (Pukatzki *et al.*, 2009). Os efetores de virulência Hcp e VgrG-1 foram caracterizados em *Agrobacterium tumefaciens* e *Vibrio cholerae* respectivamente sendo translocados até a célula do hospedeiro de modo dependente do SST6 (Wu *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009). No entanto, apesar de *Xanthomonas* possuir no seu cromossomo genes que codificam o aparato de secreção tipo VI, ainda não foi atribuído ao SST6 nenhuma função na sua virulência (Buttner and Bonas, 2009).

1.2.2. Estruturas localizadas na superfície da célula de *Xanthomonas spp* envolvidas com a virulência

A goma xantana, lipopolissacarídeos (LPS), pilus tipo 4 (PT4) e adesinas são estruturas presentes na superfície da célula de *Xanthomonas*, importantes para promover a sua virulência (Figura 4). O exopolissacarídeo goma xantana fornece um aspecto mucóide para colônia de *Xanthomonas*, sendo um polímero formado por unidades de pentassacarídeo, cuja cadeia linear é formada por duas unidades de glicose e a ramificação por um trissacarídeo composto de duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico (Figura 5).

Xantana é empregada comercialmente como espessante nas indústrias alimentícia, petroquímica e farmacêutica (Jansson *et al.*, 1975; Becker *et al.*, 1998).

Figura 4. Modelo representativo dos fatores importantes para a virulência de *Xanthomonas spp.* As adesinas permitem a aderência da bactéria no tecido da planta. Pilus tipo 4 também é importante para a aderência, e em algumas espécies de *Xanthomonas*, que apresentam infecção sistêmica, atuam na mobilidade bacteriana. O EPS e LPS protegem a célula bacteriana de compostos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro. O SST2 transloca para o espaço apoplástico enzimas que atuam na degradação da parede celular da planta. O SST3 promove o transporte para dentro do citoplasma da célula vegetal de proteínas efectoras que atuam bloqueando as respostas de defesa do hospedeiro. A sobreposição das defesas da planta permite que o patógeno se desenvolva no tecido vegetal com aparecimento dos sintomas da doença. MI, membrana interna; MO, membrana externa; PC, parede celular da célula vegetal; MP, membrana plasmática da planta (modificado de Buttner & Bonas, 2009).

Figura 5. Estrutura unitária (monômero) do polissacarídeo de goma xantana.

A biossíntese da goma xantana é realizada por enzimas codificadas pelo *operon gum* (*gumBCDEFGHIJLM*), o qual está presente em todas as espécies de *Xanthomonas* (Dunger *et al.*, 2007b). Devido à consistência altamente hidratada e aniônica, xantana protege a bactéria contra estresses ambientais tais como desidratação e compostos tóxicos. A goma contribui também para a sobrevivência epifítica da bactéria na planta e desenvolvimento da patogenicidade. Interessantemente os genes *gum* são dispensáveis para desenvolvimento do cancro cítrico em *Citrus sinensis* (laranja pêra), mas contribui para virulência em *Citrus limon* (limão-Siciliano), sugerindo que a contribuição da goma xantana na virulência depende do hospedeiro e das condições ambientais (Yun *et al.*, 2006; Dunger *et al.*, 2007b; Rigano *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2007).

Outros fatores associados à superfície bacteriana e envolvidos na virulência de *Xanthomonas* são os lipopolissacarídeos (LPS) (Dow *et al.*, 2000). O LPS está presente em bactérias Gram-negativas e caracteriza-se como uma molécula tripartida, sendo constituído pelo lipídeo-A, ancorado na membrana externa, um grupo de oligossacarídeos e outro de polissacarídeos, formando as cadeias laterais denominadas antígeno-O (Marolda *et al.*, 2004; Buttner and Bonas, 2009; Li and Wang, 2011). Em *Xanthomonas* 15 genes que formam o

locus wxc (Meyer *et al.*, 2001; Newman *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 2000; Silipo *et al.*, 2005; Vorholter *et al.*, 2001; Dow *et al.*, 1995) estão envolvidos com a síntese do LPS. Mutações em genes do *locus wxc* deixam a bactéria mais susceptível a estresses ambientais e atenuam a virulência de *Xanthomonas* (Newman *et al.*, 2008; Vorholter *et al.*, 2001; Newman *et al.*, 1997; Dow *et al.*, 1995; Li and Wang, 2011).

No estágio inicial de colonização a célula bacteriana tem que interagir com o tecido do hospedeiro através de proteínas adesinas específicas, que são ancoradas na membrana externa da célula do patógeno. As adesinas podem ser classificadas em adesinas fimbriais e não fimbriais. As adesinas fimbriais constituem complexos protéicos filamentosos similares ao pilus tipo 4, os quais são estruturalmente relacionados ao SST2. Já as adesinas não fimbriais são secretadas por meio do SST5 que inclui autotransportadores, como YadA de *Yersinia sp*, e sistema de secreção *two-partner*, no caso da hemaglutinina de *Bordetella pertussis* e YapH de *Yersinia sp* (Felek and Krukoni, 2009; Lawrenz *et al.*, 2009).

Em *Xanthomonas* foram caracterizadas as adesinas não fimbriais XadA e XadB, homólogas a YadA de *Yersinia*, e também homólogos de YapH e a hemaglutinina FhaB (da Silva *et al.*, 2002; Darsonval *et al.*, 2009; Thieme *et al.*, 2005; Salzberg *et al.*, 2008; Vorholter *et al.*, 2008). Assim como as adesinas não fimbriais, o pilus tipo 4 (PT4), localizado na superfície celular de *Xanthomonas*, pode contribuir para a virulência e adesão da bactéria na epiderme das folhas e sementes do hospedeiro (van Doorn *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 2002; Darrasse *et al.*; Darsonval *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2009; Gottig *et al.*, 2009). O PT4 também contribui especialmente para virulência das espécies de *Xanthomonas* que apresentam o modo de infecção sistêmica como no caso de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Lim *et al.*, 2008; Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1995).

1.3. Comunicação célula-célula (*Quorum-sensing*) em bactérias

Em bactérias o processo de comunicação célula-célula também denominado de *quorum-sensing* consiste de um mecanismo de sinalização química que ocorre em condições de alta densidade celular (Waters and Bassler, 2005). O *quorum-sensing* altera a expressão gênica e ativa um comportamento cooperativo entre as bactérias da mesma espécie (Whitehead *et al.*, 2001; Waters and Bassler, 2005; Baysse *et al.*, 2005). Dentre as funções reguladas pelo *quorum-sensing* pode-se destacar: produção de bioluminescência, esporulação, conjugação, produção de antibióticos, biofilme mobilidade e virulência (Waters and Bassler, 2005). A Figura 6 representa um modelo de uma das vias de sinalização mais simples que controla a comunicação célula-célula na bactéria *Vibrio fischeri*: Sistema LuxI/LuxR.

Figura 6. Modelo de *quorum-sensing* em *V. fischeri* envolvendo o sistema de sinalização LuxIR e o autoindutor-1. Δ representa o autoindutor-1 (AI-1) produzido por LuxI. Em condições de alta densidade celular têm-se um aumento da concentração do AI-1 no meio, o que propicia a sua ligação na proteína receptora LuxR. O complexo LuxR/AI-1 ativa a expressão do *regulon* do *quorum-sensing*, que no caso ativa a produção de bioluminescência (modificado de Waters & Bassler, 2005).

As pequenas moléculas sinalizadoras do *quorum-sensing* são denominadas auto-indutores (AIs) e podem pertencer a um número crescente de famílias de compostos

orgânicos. Entre eles destacam-se as acil-homoserinalactonas (HSL), também chamadas de autoindutor-1, sendo produzidas pelas bactérias Gram-negativas, e as butirolactonas e peptídeos produzidos pelas Gram-positivas (Figura 7). Com o avanço das pesquisas na área, novos AIs tem sido caracterizados, como por exemplo, o autoindutor-2 (furanosil borato diéster) nas enterobactérias e a família DSF constituída por ácidos graxos insaturados com até 16 carbonos presentes em *Xanthomonas*, *Xylella*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* (Dow, 2008; He and Zhang, 2008) (Figura 7). A síntese do autoindutor-1 requer a presença de proteínas homólogas a LuxI, enquanto a síntese do autoindutor-2 é realizada por LuxS (Waters and Bassler, 2005). Os mecanismos de percepção dos AIs no meio muitas vezes envolvem sistemas de transdução de sinal denominados sistema de dois componentes.

Autoindutor	Estrutura	Bactéria
Gram-Negativa		
N-Acil Homoserina Lactona (HSL)		<i>V. fischeri</i> (n=1; R= H) <i>A. tumefaciens</i> (n=2; R=O) <i>E. carotovora</i> (n=2; R=OH) <i>P. aeruginosa</i> (n=4; R=O) <i>V. harveyi</i> (n=0; R=OH)
Família do AI-2	(A) (B)	<i>V. harveyi</i> (A) <i>S. typhimurium</i> (B)
Hidroxi-palmitico metiléster		<i>R. solanacearum</i>
Quinolona sinal de Pseudomonas (PQS)		<i>P. aeruginosa</i>
Família de DSF		<i>X. campestris</i>
	<i>S. maltophilia</i>
	<i>B. cenocepacia</i> <i>X. fastidiosa</i>
Gram-Positiva		
γ-Butirolactonas		<i>S. griseus</i>

Figura 7. Estruturas químicas das diversas moléculas sinalizadores do processo de *quorum-sensing* em bactérias (He and Zhang, 2008).

1.4. Sinalização via sistema de dois componentes

As vias de sinalização envolvendo sistemas de dois componentes em bactéria são formadas por histidinas quinases e seus respectivos substratos denominados reguladores de respostas (RR) ou domínio receptor (Figura 8). Os RR apresentam um resíduo de aspartato conservado no domínio regulador fusionado ao domínio efetor (Figura 8), que pode funcionar como fator de transcrição ou uma enzima. O estado de fosforilação do domínio receptor controla a atividade do domínio efetor. As histidinas quinases normalmente são proteínas híbridas apresentando adicionalmente um ou mais domínios sensores, os quais captam sinais do ambiente e estimulam ou inibem a sua autofosforilação. As histidinas quinases podem também apresentar-se fusionadas ao domínio regulador de resposta (RR) e ao histidina-fosfotransferase (Hpt), que recebem e transferem o grupo γ -fosforil da molécula de ATP.

A Figura 8 representa um exemplo de um sistema de dois componentes típico. Uma histidina quinase em resposta a um estímulo ou sinal externo se autofosforila promovendo a ligação do grupo γ -fosforil no resíduo de histidina conservado. Sequencialmente o grupo fosfato é transferido para um resíduo de aspartato conservado no seu domínio RR. A fosforilação do RR conduz mudanças na fisiologia da célula devido à ativação do seu domínio efetor (Klumpp and Krieglstein, 2002). Esses múltiplos passos de transfosforilação são componentes importantes para controlar o comportamento bacteriano, modificando a fisiologia celular e o programa de expressão gênica em resposta a sinais extracelulares (Appleby *et al.*, 1996; Ulrich *et al.*, 2005; Skerker *et al.*, 2005b).

Em *Xanthomonas* poucos sistemas de dois componentes foram estudados e suas funções determinadas. Entre os sistemas de dois componentes caracterizados em *Xanthomonas spp* destacam-se: RpfC/RpfG em *X. campestris* pv *campestris*/*X. oryzae* pv *oryzae* responde ao aumento da densidade celular controlando a mobilidade e produção de fatores de virulência (Fouhy *et al.*, 2006); RavS/RavR *X. campestris* pv *campestris* é ativado

em condições de hipóxia, regulando a mobilidade produção de goma e virulência (He *et al.*, 2009); ColS/ColR em *X. campestris* pv *campestris* e PhoP/PhoQ em *X. oryzae* pv *oryzae* são reguladores positivos da virulência, ativando a expressão de genes *hrp* que formam o SST3 (Zhang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008).

Figura 8. Sistemas de dois componentes. Um sinal externo ou da própria célula controla a autofosforilação da Histidina quinase e consequentemente a ativação do domínio efector do regulador de resposta (Appleby *et al.*, 1996; Ulrich *et al.*, 2005; Skerker *et al.*, 2005b).

1.5. O sistema *rpf* (fatores reguladores da patogenicidade) controla a via de *quorum-sensing* em *Xanthomonas spp*

O modelo mais bem estudado de regulação da via de *quorum-sensing* em *Xanthomonas* é a espécie *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (XCC), onde as proteínas RpfC e RpfG funcionam como um sistema de dois componentes atuando na percepção da densidade celular e controlando a mobilidade e produção de fatores de virulência (Dow *et al.*, 2003; Crossman and Dow, 2004b; Slater *et al.*, 2000a). O locus *rpf* em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (XAC) é constituído por 7 genes nomeados *rpfA-G* (Figura 9) (da Silva *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006). Esses genes codificam proteínas relacionadas com a adaptação de *Xanthomonas* em função da densidade celular durante o processo de *quorum-sensing*.

Figura 9. Mapa gênico da região contendo o *locus rpf* no cromossomo de XCC e XAC. Destaque para os genes *rpfC-rpfG-rpfF-rpfB* que atuam na regulação do processo de *quorum-sensing* em *Xanthomonas*.

A interação física entre as proteínas RpfC e RpfG foi caracterizada em nosso laboratório e estudos adicionais sobre a importância dessa interação para regular a fisiologia e virulência de *Xanthomonas* foram realizados pelo grupo do Dr. Max Dow, Biomerit, Cork University - Irlanda (Andrade *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006a; Ryan *et al.*; Ryan *et al.*, 2010a). RpfC é uma proteína híbrida com domínios sensor, histidina quinase RR e Hpt, e RpfG, uma proteína reguladora de resposta com resíduo de aspartato conservado e um domínio efetor HD-GYP, cuja função de fosfodiesterase foi determinada por análise *in silico* e experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (Ryan *et al.*, 2006a; Ryan *et al.*, 2010b; Crossman and Dow, 2004b; Galperin *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2010a).

Nosso grupo também demonstrou que RpfC interage com a proteína RpfF, uma enzima homóloga a enoil-coA hidratase que atua na via de biossíntese da molécula sinalizadora do *quorum-sensing* em *Xanthomonas* – DSF, fator de sinalização difusível (Figura 10) (Andrade *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Mutantes de XCC em *rpfF* apresentam deficiência na produção de DSF, demonstrando um comportamento agregativo (Crossman and Dow, 2004b; Dow *et al.*, 2006; Dow *et al.*, 2003). Adicionando DSF no meio onde o mutante *rpfF* cresce resulta na dispersão das células, reduzindo os agregados no meio. Resultados publicados por Slater *et al.* (2000) mostraram que DSF ativa, através do sistema de dois componentes RpfC-RpfG, a produção de goma xantana e fatores de virulência (enzimas

extracelulares: proteases, endoglucanases, pectinases) em XCC. Adicionalmente, foi confirmado em nosso laboratório que RpfF interage especificamente com o domínio RR de RpfC (Andrade *et al.*, 2006). Após a publicação do nosso trabalho, (He *et al.*, 2006a) mostrou que a expressão somente do domínio RR de RpfC no mutante *rpfC* em XCC reprime a super produção de DSF do mutante *rpfC*, suprimindo o fenótipo do mutante. Esses resultados demonstram a importância da interação RpfC-RpfF em regular a produção do autoindutor (DSF) e consequentemente os fenótipos ativados pela via de *quorum-sensing*.

Figura 10. Estrutura química do fator de sinalização DSF de *Xanthomonas*. O DSF é um derivado de ácidos graxos (cis-11-metil-2-dodecenoico α,β insaturado) cuja biossíntese tem a participação das proteínas RpfF e RpfB do sistema de *quorum-sensing* (Wang *et al.*, 2004).

No modelo proposto para o funcionamento da via de transdução de sinal RpfC-RpfG, o aumento da concentração de DSF no meio, devido ao aumento da densidade celular, permite sua ligação no domínio sensor de RpfC. Desse modo, a autofosforilação de RpfC no domínio histidina quinase é ativada, e o grupo γ -fosfato do ATP é transferido ao resíduo de histidina conservado nesse domínio. A seguir o fosfato é transferido para os domínios RR e Hpt respectivamente chegando até o domínio receptor de RpfG. RpfG é ativada e seu domínio efetor HD-GYP atua regulando a concentração do segundo mensageiro diGMP cíclico (c-diGMP) na célula (Ryan *et al.*, 2006a; Fouhy *et al.*, 2006) (Figura 11). Dados publicados mostram que a redução da concentração de c-diGMP na célula é crítica para ativação da síntese de goma xantana, fatores de virulência e mobilidade em XCC (Ryan *et al.*, 2007; Crossman and Dow, 2004b).

Figura 11. Modelo de ativação da síntese de fatores de virulência em *X. campestris* sob a influência do DSF. A ligação de DSF no domínio N-terminal da RpfC leva a autofosforilação do domínio fosfoceptor histidina quinase (HisKA). A fosfo-transferência ocorre através do domínio receptor (RR) e do domínio Hpt da RpfC para o domínio receptor RR da RpfG, o que leva à sua ativação como uma diGMP cíclico fosfodiesterase. Possivelmente RpfC também pode reconhecer outros estímulos ambientais que levam a ativação da RpfG. As setas indicam as reações de fosfo-transferência (Crossman *et al.*, 2004). DSF-“Difusible Signal Factor”; HisKA-aceptor histidina quinase; HATPase-histidina quinase/ATPase; HPT-histidina fosfo-transferência; RR-regulador de resposta; HD-GYP-fosfohidrolase metal-dependente relacionada com transdução de sinais e atividade diGMP cíclico fosfodiesterase.

Adicionalmente, um mutante de XCC no gene *clp* - Cap Like Protein, que codifica uma proteína homóloga a CAP (proteína ativadora do catabolismo) de *E. coli*, apresenta fenótipos similares aos fenótipos descritos para os mutantes *rpfF*, *rpfC* e *rpfG*, tais como redução da virulência e mobilidade e diminuição da produção de goma xantana. Estas observações indicam que Clp participa da via de *quorum-sensing* mediado por DSF em *Xanthomonas*. O principal questionamento que até então se tinha, era como o sinal mediado por DSF e transduzido por RpfC até RpfG, seria sentido por Clp na célula. Para XCC e XAC foi demonstrado que o segundo mensageiro c-diGMP pode ligar-se ao domínio NBS (*Nucleotide Binding Site*) de Clp (Tao *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2010; Leduc and Roberts, 2009). A interação de Clp com c-diGMP promove uma alteração conformacional no seu domínio HTH (*helix-turn-helix*), impedindo que Clp se ligue no promotor do gene *engXCA* (Chou, 2011). EngXCA é uma endoglucanase cuja expressão é regulada positivamente pela

via do *quorum-sensing* em XCC (Hsiao *et al.*, 2005; Chin *et al.*, 2010). Dessa forma, em altas concentrações na célula, o c-diGMP atua bloqueando a ligação do ativador transcricional Clp nos seus promotores alvos. Durante o processo de *quorum-sensing*, o domínio efetor HD-GYP de RpfG encontra-se ativado e reduz a concentração do c-diGMP em XCC, liberando Clp da inibição pelo segundo mensageiro (Figura 12).

Figura 12. Modelo de regulação envolvendo o sistema Rpf, Clp e proteínas GGDEF em *Xanthomonas*. O sinal DSF, produzido por RpfF, liga-se no domínio sensor da histidina quinase RpfC, a qual transfere um grupo γ -fosforil para o domínio regulador de resposta de RpfG, ativando a atividade de fosfodiesterase do seu domínio HD-GYP. A concentração reduzida de c-diGMP aumenta a afinidade de Clp pelo promotor da endoglucanase (*engXCA*). Neste modelo Clp está inibida por altas concentrações de c-diGMP na célula (Chin *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2010). Interações observadas em nosso laboratório são indicadas por linhas grossas (Andrade *et al.*, 2006). A fosforilação do domínio RR de RpfG pode modular a interação do seu domínio HD-GYP ao domínio GGDEF de um grupo de proteínas de XAC. Abreviações: DSF, fator de sinalização difusível; F, RpfF; Tm, domínio transmembrana; HK, domínio histidina quinase; RR, domínio regulador de resposta; Hpt, domínio histidina fosfotransferase; GGDEF, domínio diguanilato ciclase; Clp, proteína homóloga ao regulador de transcrição CAP de *E. coli*; NBS, sítio de ligação de nucleotídeo; HTH, domínio de ligação ao DNA (hélice-volta-hélice); P, grupos fosfatos ligados nos resíduos conservados de aspartato nos domínios RR e histidina nos domínios HK e Hpt; IM, membrana interna.

1.6. Domínios GGDEF, EAL e HD-GYP - reguladores da concentração de diGMP cíclico em bactérias

A finalização dos projetos genomas de diversas espécies de bactérias permitiu identificar vários domínios frequentemente associados com sistemas de dois componentes. Inicialmente as funções de muitos destes domínios eram desconhecidas. Dois dos mais abundantes, anteriormente denominados DUF1 e DUF2, e agora conhecidos como GGDEF e

EAL tiveram suas funções estudadas em diferentes espécies de bactérias (Romling *et al.*, 2005; Galperin *et al.*, 2001; Jenal and Malone, 2006).

O domínio GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe), o qual apresenta os resíduos de aminoácidos Gly-Gly-Asp-Glu-Phe conservados, atua como uma diguanilato ciclase sintetizando a molécula diGMP cíclico (c-diGMP) a partir de duas moléculas de GTP (Figura 13). O c-diGMP atua como um segundo mensageiro regulando, de modo geral, o estilo de vida das bactérias, decidindo entre o comportamento sésil ou móvel, e ainda controla a virulência bacteriana. O aumento da concentração de c-diGMP em bactérias ativa a agregação celular, produção de exopolissacarídeos, formação de biofilme resistência a antibióticos e inibe a mobilidade e produção de fatores de virulência (Romling *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2004; Jenal and Malone, 2006; Hoffman *et al.*, 2005) (Figura 14).

Figura 13. Estrutura molecular do segundo mensageiro bacteriano c-diGMP.

Por outro lado, o domínio EAL, que apresenta os resíduos Glu-Ala-Leu conservados, atua como uma fosfodiesterase promovendo a diminuição da concentração do c-diGMP na célula. A diminuição da concentração de c-diGMP na célula pode promover o aumento da mobilidade produção de fatores de virulência, resistência a antibióticos e tolerância a agentes oxidantes do hospedeiro (Romling *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2004; Jenal and Malone, 2006;

Hoffman *et al.*, 2005) (Figura 14). O domínio HD-GYP, inicialmente caracterizado como domínio efetor de RpfG, era proposto por Galperin *et al.* (2001) atuar como fosfodiesterase na degradação de c-diGMP. Esta atividade foi confirmada experimentalmente por Ryan *et al.* (2006).

Assim como a atividade de HD-GYP foi determinada, os domínios EAL e GGDEF também tiveram suas atividades confirmadas *in vitro* e *in vivo* para várias espécies de bactérias (Kuchma *et al.*, 2007; Simm *et al.*, 2004). Domínios parálogos de GGDEF e de EAL podem atuar no controle de diferentes fenótipos bacterianos. Por exemplo, *Salmonella typhimurium* possui 18 genes que codificam proteínas com domínio EAL, mas um mutante que não produz uma dessas proteínas não é capaz de colonizar o hospedeiro por se tornar sensível a espécies reativas de oxigênio (Hisert *et al.*, 2005).

Figura 14. Estrutura e funções fisiológicas de c-diGMP adaptado de (Hengge, 2009). As concentrações de c-diGMP são controladas na célula por diguanilato ciclases que apresentam o domínio GGDEF (em vermelho) e fosfodiesterases específicas com domínio EAL ou HD-GYP (em azul). O c-diGMP pode reduzir a mobilidade reprimindo a expressão de genes do flagelares ou ainda interferindo na função do motor flagelar. Baixas concentrações de c-diGMP são requeridas para a expressão de genes de virulência. Em várias espécies de bactérias, a elevada concentração de c-diGMP estimula formação de biofilme expressão de adesinas e exopolissacarídeos. A polaziração de GGDEF promove a produção localizada de c-diGMP, o que regula a proteólise do inibidor de replicação, permitindo a progressão do ciclo celular em *Caulobacter crescentus*.

1.7. Proteínas GGDEF, EAL e HD-GYP de XAC

Em XAC são encontrados 31 genes com domínio GGDEF, 14 codificam EAL e 3 domínios HD-GYP (Figura 15). Na maioria dos casos, estes domínios apresentam-se fusionados a outros domínios envolvidos na sinalização celular em bactérias (PAC, PAS, GAF e RR). No genoma de XCC foram identificados 21 genes que codificam proteínas com somente um domínio GGDEF, 5 com um domínio EAL, mais 8 com ambos os domínios GGDEF e EAL, e 3 com somente o domínio HD-GYP (Galperin, 2006).

Nosso grupo demonstrou que o domínio HD-GYP de RpfG interage com o domínio GGDEF de um grupo de proteínas de XAC (Andrade *et al.*, 2006). A posteriori, esta interação entre os domínios RpfG_{HD-GYP} e proteínas GGDEF também foi verificada em XCC (Ryan and Dow, 2011)

Especialmente demonstramos que o domínio RpfG_{HD-GYP} de XAC interage com nove proteínas contendo domínios GGDEF (XAC0258, XAC0424, XAC0593, XAC0644, XAC1420, XAC1486, XAC1939, XAC1940 e XAC2382). A maioria destas proteínas, além de apresentar o domínio GGDEF, também possui outros domínios associados, como por exemplo, domínio sensor para captar sinais intra ou extracelular e regular a atividade de diguanilato ciclase (Andrade *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2010a) (Figura 15).

Figura 15. Arquiteturas das proteínas GGDEF, EAL e HD-GYP codificadas pelo genoma de XAC adaptado de (Andrade *et al.*, 2006). As proteínas foram agrupadas de acordo com as similaridades dos seus domínios. O número do gene no genoma de XAC que codifica a proteína está mostrado no lado direito (Da Silva *et al.*, 2002). Destacado em roxo estão os números dos genes que codificam as proteínas com domínio GGDEF que interagiram com o domínio HD-GYP de RpfG no ensaio de dois híbridos. As seguintes proteínas com domínio GGDEF são preditas terem hélices transmembranas pelo programa PSort (Nakai and Horton, 1999): XAC3460, 1570, 1939, 1940, 1486, 0593, 0644, 2382, 2711, 1938, 2812, 1993, 2897, 1345 and 1488. Todos os domínios estão caracterizados de acordo com o programa Pfam database (<http://pfam.wustl.edu/>).

A Figura 16 mostra a frequência relativa de conservação dos aminoácidos em proteínas GGDEF em bactérias. Análise comparativa das estruturas primárias dos domínios GGDEF presentes no genoma de XAC revela que algumas diguanilato ciclases possuem o sítio ativo (sítio-A) degenerado, portanto podendo não apresentar atividade enzimática (Fig. 16). No entanto, algumas destas proteínas GGDEF podem ter mantido a capacidade de apenas se ligar a e c-diGMP através do seu motivo RxxD denominado sítio alostérico (sítio-I). O complexo GGDEF-cdiGMP pode ter se especializado em regular um determinado processo celular através da interação proteína-proteína, como no caso da proteína PopA (Parálogo de PleD) em *C. crescentus*. O complexo PopA-cdiGMP é direcionado para um dos pólos celulares e ativa a proteólise do inibidor de replicação o que permite a progressão do ciclo celular (Duerig *et al.*, 2009). Na figura 17 podemos constatar que a metade das GGDEF codificadas por XAC apresentam o sítio-I (RxxD) conservado e por outro lado um terço delas mostram os resíduos G/G/D-E/E/F do sítio-A degenerados. As diguanilato ciclases que interagem com o domínio RpfG_{HD-GYP} possuem o sítio ativo (sítio-A) conservado, sugerindo que todas têm a capacidade de sintetizar c-diGMP.

Figura 16. Frequência relativa de conservação dos aminoácidos nos domínios GGDEF de bactérias (adaptado de Galperin *et al.*, 2001).

Xac0258	TEELSRTDEL TGLHNRRGLA--LHLQEC--RRAGHVPGVGLILI DCDRFKRI NDEFGHLA	56
Xac1486	LEELASLDAL TGLPNRRMLERALTHQID--QRQPHDLNLSLIIL DLDHFKEVNDLYGHAA	58
Xac0593	LSRLAMRDEL TGLPNRRRAITTEAQQQIE--QALRSHT PGMLALI DLDHFKEVNDLYGHAT	58
Xac0614	LLDDAQRNAL TGLNRNKT FDDVILRLFAGGADSAAEQGVWL GIVDIDHFKRVNDTFGHLY	60
XAC2482	LQDLATRDFTL TGLPNRRYFLEQSQRVIP--KLLL EDQTVTAA MV DIDHFKHINDTWGHEA	58
XAC3460	LEYRASHDVL TALPNRRERVLQQWFD--EAHAGGAALALAM DIDHFKRINDDYGHV	58
Xac1939	LALKASHDAL TGLLNRS GILEAMAEELQGC AHGE--HPLAVVLI DLDHFKEVNDYGHV	58
Xac1940	LSLKATHDEL TGLLNRA GILAAAL REMLLHAEHQG--RPLAVVLI DLDHFKEVNDYGHV	58
Xac1420	LAEQASRDAL TGVPNRHQ LGTALT HFE LASRQG--WPLSIAFI DLDHFKRVNDYGHV	58
Xac1570	FERQAHDAL TGLPNRRHFDEALARDISRARRSA--RPLVLAIL DIDHFKRINDDYGHV	58
Xac0644	LKKHALFDPL TEALNRRGCEQAMRDSVIA SQREG--WPFVLFVL DMDNLKQINDRFGHLA	58
Xac4358	-LEWSFTDPL TNCYNRRFLDEL DKRDPVR-----WGCIVV DLDKFKLVNDYGHV	51
Xac0424	VAGLVREDQLT GALNRRGFEELEFQREAVRTQ RSG--QPLCVAML DLDHFKRVNDYGHV	58
Xac1345	LRRQSRDAL TGLYNRRYLEESLSHELARCARRG--LPLPVLML DVDHFKRVNDYGHV	58
Xac1488	LRQQSIRDPL TGLYNRRYLEETLSHELARCTRRE--LPLSVIML DVDHFKRVNDYGHV	58
Xac2897	LSTEAWVDAL TGIANRRAFDHRLSRALQDAVRLE--APLSVIMI DVDHFKRVNDYGHV	58
Xac2810	LVEQTRTDPL TGLPNRRRAFAVALAA TEQTRAVG--QPLSVALL DVDHFKRVNDYGHV	59
Xac2446	VELDALRDAL TGRWNRRAGLEHALHALADAPSS--AADAPLGFMLL ELDFGFKRVNDYGHV	58
Xac2812	VAFHARHDAM TGLINRRHEIERRLLRLITELPQ--SPQMCHALCFV DLDHFKRVNDYGHV	58
Xac0610	MHERATRDAL TGLPNRRHAWSEALQVAVAQAQQQQ--RSVAVMFL DLDGFKRVNDYGHV	58
XAC2711	ILHQARHDAL TGLPNRIWLLERLKDVDVDTVASG--GTAAVLIL DLERFKEVNDYGHV	58
Xac2382	VRHMA YTDAL TGLTNRLGFREGLDHLLHTARSTD--SKLALLFA DIDHFKRVNDYGHV	58
Xac1938	LALA TLHDPL TRLPNRIILLHEHLVQNIERRAQ RQG--QRFVAVML NLDGFKRVNDYGHV	58
Xac1993	IELLAHYDRL TGLPNRRFLREQAENAIERANERG--QTLAMLLI DLDGFKRVNDYGHV	58
Xac1887	VHQLAFYDTL TGLPNRIMFSARAEQALQAEYAG--EPAALMFI NIDHFKRVNDYGHV	58
Xac1992	-----IVKPTRLGAGSPELHLVDAASGG--PPLMIF HV DLDHFKRVNDYGHV	49
Xac2398	---LRQRDQV TGLLNRRPTFMVAL EQAVAQAGRSE--GQSG FLII EPDHYARILPEFLGDS	55
Xac1795	LRSTTY RDGPTGLPNRRSFSEDLDTWLSQRDTAPATTAVAI DVCGS DYFRDMVKALGWY	60
Xac0495	--VSVRSNPETGLPTRGHVMDLLADALERKQSGG-----LFFI EIASALGLRERYGYAA	52
Xac0258	GDRVLQNV A----HALRSVIAEGDLACRI GGDEF VLVA QGTS ELVHHIGECIVR-AVEA	111
Xac1486	GDAALSDLA----TILRFVREPHQVFRGGEEFVLL RAGSLAELEAATERLRK-VIRN	113
Xac0593	GDTV LKALA----SASRLALRGQDLRGRI GGEEFVLLVP GCGEEE IPTVFTRLRS-AVAA	113
Xac0614	GDEVLLVA----QLMQRAERQDDLFREGGEEFVIVL RGVDRDTAVSLFERFRLVA EH	116
XAC2482	GDQALRAVA----ASVSGHARPQDLVARGGEEFVLLVP GLDAANATSYFETLRERISA-	113
XAC3460	GDAVL SAIG----EVLSEQDQAHCFARFGGEEFVLLA TGLDAVQARALFERMRQLAD-	113
Xac1939	GDAVLA KVG----ARLTACIRDSDKVGRYGGEEFVLLLP GMSQQSQ-HRLRAIHEALS LA	113
Xac1940	GDAVLA GVG----RRMDTLMRGDDRIGRYGGEEFVLLLP GLNL DAT-HRLDALHRGICGD	113
Xac1420	GDEVLRNFA----QTLQRMVRTSDLVARYGGEEFVILP NTPADAALMVI ERILAETART	114
Xac1570	GDAVL HEVG----VLLTAAARASDLPARI GGEEFVALLA DTTLDEA-QALCLIRIRALFHA	113
Xac0644	GDRVLVRLV----DSAYGWLQADQVGRVGGDEF LIGHAS----EDD ATKLKLNQWLSML	110
Xac4358	GDEVLVQMA----WFLNQPIRTQDLVRI GGDEFVLL HQA----SQTQLDALKR DY---	100
Xac0424	GDAALRHTV----EVAKAVLR TTDIAIRGGEEFVLLLP DSTIFEASAAVI RLQRALSQR	114
Xac1345	GDLLAAV G----ELLLTRIRAEADVACRYGGEEFVLLP EADGEEAMRVAEIRGYIAL	114
Xac1488	GDRVLA AI G----ELLLA QTRGEDICCRYGGEEFVILP EVDLPTACMMAEKLRA GIEAL	114
Xac2897	GDACLR LIA G----AIA GCSFRSEDLAARYGGEEFVILP HTDAAGALRLADAVRNAVA EL	115
Xac2810	GDAVL RELS----TLLRAHMA GAGTIARYGGEEFVLLLP NANLQARVQCEYLRQSVAM	114
Xac2446	ADATLLQVAT---LLEAQLEP-AAVA RIACDQFCVALPA TAASAAALAA AEDLRKAVEDA	115
Xac2812	GDRFLCHFAD---VITMQLF S-GDWLGRIGGDEFVLLA NTDLAQAVILERMHGALGQP	114
Xac0610	GDAVLVAF G----SCLQRAR GERYLVARIAGDEFVLL DGLQDAQAECAAVA ERITLAA	114
XAC2711	ADQVLV EAGRRRLVDVVQEPN----LVGRIGSDEFVVA QADAAS-VQDQQLLLQLRR	113
Xac2382	GDEALLQFASRISRAVAALGGDDATLA REGGDEFVILL QSGDVSLLAA QLADRLVHLSR	118
Xac1938	GDRLLVVVA ERLNAHRRHAG----SLARIGADEF-VLVA DIADPEDAAALAA HLVAQALAV	113
Xac1993	GDNLKLASARLHQHLRNSI----LFGRES DDEFVLL RDMSEPEDAGHVARKLIAAL GE	114
Xac1887	GDGLLRDIALRVNDQVAA TA----MLARISGDEFVLLALP QCS-AEQASAAAERLLVSIAS	113
Xac1992	GDQALTLAAR---RLQEF LGARGKLWRFGSDEM VVAVRRDDTPLPEDFAEEIRQQLLEL	105
Xac2398	ADALIAALA----AHVASVIDDSVLAAREGEHSFALLLNGN-YARTHALAE TVRNAFAQH	110
Xac1795	ADGYIALAQ R---RLAA YIPGGTLLYRI DPTTFGFLAQAE G--QRLATLCTKVS KAFTE	114
Xac0495	YERLMTQAG----HRLASAPQPYPLARINDNSFLLAV DMPEASLEQQALEIRQLSAN	107

Figura 17. Análise comparativa dos resíduos presentes nos domínios GGDEF de XAC. A caixa verde destaca os resíduos RxxD do sítio alostérico (sítio-I), e caixa preta os resíduos que formam o sítio ativo (sítio-A) das enzimas diguanilato ciclasas de XAC. As proteínas que possuem o sítio-I conservado são: XAC593, XAC0614, XAC2482, XAC1939, XAC1940, XAC1420, XAC1570, XAC0644, XAC4358, XAC0424, XAC1345, XAC1488, XAC2897 e as GGDEF XAC2812 e XAC1993 com RxxD deslocado no alinhamento. O grupo de proteínas GGDEF que têm o sítio-A conservado, portanto podem sintetizar c-diGMP, são: XAC0258, XAC1486, XAC0614, XAC2482, XAC3460, XAC1939, XAC1940, XAC1420, XAC1570, XAC0644, XAC4358, XAC0424, XAC1345, XAC1488, XAC2897, XAC2810, XAC2812, XAC2382.

1.8. Os receptores para c-diGMP regulam diferentes processos na célula bacteriana

O primeiro receptor para c-diGMP a ser identificado foi o domínio PilZ da subunidade A da celulose sintase em *Gluconobacter xylinus* (Jenal and Malone, 2006; Ross *et al.*, 1987). Neste caso o c-diGMP funciona como ativador alostérico ligando-se no domínio PilZ e ativando a síntese de celulose no complexo da celulose sintase. Desde então, outras proteínas com o domínio PilZ foram identificadas nos vários genomas bacterianos por análise de bioinformática (Amikam and Galperin, 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* com proteínas contendo o domínio PilZ, determinaram que sua ligação ao c-diGMP regula a mobilidade e virulência em bactérias (Pratt *et al.*, 2007; Christen *et al.*, 2007). A ligação do nucleotídeo ao domínio PilZ é mediada pelos resíduos RxxR e DxSxxG. Alguns membros desta família possuem modificações neste motivo, o que resulta na perda da capacidade de ligar-se ao c-diGMP (Guzzo *et al.*, 2009). No entanto, esses domínios degenerados podem atuar regulando processos celulares como mobilidade através da interação proteína-proteína (Guzzo *et al.*, 2009).

O genoma de XAC apresenta quatro proteínas com domínio PilZ: a região carboxi-terminal da subunidade A da celulose sintase (XAC3518), proteína reguladora da biogênese do pilus tipo 4 (denominada PilZ XAC1133) e duas proteínas hipotéticas (XAC1971 e XAC3402). A Figura 18 apresenta proteínas com o domínio PilZ codificadas pelo genoma de XAC. Na Figura 19 um alinhamento entre os aminoácidos que constituem os domínios PilZ de XAC mostra uma baixa conservação, característica desta família de proteínas. A proteína XAC1133 não apresenta os resíduos RxxR e DxSxxG essenciais para ligação do segundo mensageiro. Um trabalho desenvolvido em nosso laboratório mostrou que XAC1133, apesar de não ligar-se a c-diGMP, regula a mobilidade de XAC de maneira independente do flagelo e através da sua interação com o domínio EAL de XAC2398 (homóloga a FimX de *P. aeruginosa*) e PilB (ATPase do pilus tipo 4) (Guzzo *et al.*, 2009).

Figura 18. Representação das quatro proteínas com domínio PilZ codificadas pelo genoma de XAC (Amikam and Galperin, 2006). O número do gene no genoma de XAC que codifica a proteína está mostrado no lado direito (Da Silva *et al.*, 2002).

	RXXXR	DXSXXG	
XAC1135	GDRCIQAADGLVNRLCLLVAGSA-RTCHPSMPRVEEGVAMKAPLGSA--LVA-MALLAGC	59	
XAC3518	QVRSAHVP-LDVPVTLYLPDGD-VLPSSRVNFSTGMAIMLAQPQP--IEPGLPVQIGL	630	
XAC1971	VQRMDAKLDLMLALIGRLVRQGDGSLGQGMVHWSVRGIRLSCATSHPPGTTGTSVCLQPSD	130	
XAC3402	TRRAPRQPTDLLPVIDTLSEVQIGRVG---NVSETGMLLLASVPLHDDALYQLRFSLPE	61	
	* : :	* : :	
XAC1135	ARDVGEQYVGKWVDVKSEKHV--LSIEHNGESFIIRDTPQLFGNGVKT-	106	
XAC3518	SHRGVEQTLPAVVRQDRDQ---VSIQFT--QMSMEQER-WLVASTFA--	672	
XAC1971	WLPELVQLPATVLANASDGHVWLWLRFAPLAPGLQDALERHLFRLHRRQ	180	
XAC3402	RVGRATEIDVGVLHLLWSEAAHAPGQAWAGFRFLTMSEPHRQRLRAWIAE-	110	

Figura 19. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos dos domínios PilZ identificados no genoma de XAC (Amikam and Galperin, 2006). A análise do alinhamento revela uma baixa identidade entre os resíduos encontrados nestes domínios PilZ. Em vermelho os resíduos essenciais para ligação no c-diGMP. XAC1135, proteína PilZ envolvida na montagem da pilus tipo 4 (Alm *et al.*, 1996b). XAC3518, subunidade A da celulose sintase XAC1971 e XAC3402 são proteínas hipotéticas (da Silva *et al.*, 2002). O alinhamento foi realizado com o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Com o avanço das pesquisas na área, vários outros receptores para c-diGMP têm sido descritos, entre eles destacam-se: Sítio alostérico (sítio-I) das diguanilato ciclases que apresentam a assinatura RXXD; sítios de ligação a nucleotídeo da proteína FleQ de *P. aeruginosa* e Clp de *Xanthomonas* (Jenal and Malone, 2006; Chin *et al.*, 2010). Além das proteínas receptoras, também se identificou assinaturas em RNA mensageiros que se ligam ao c-diGMP (“riboswitch”). Desta maneira, o c-diGMP regula a tradução e a estabilidade de RNA mensageiros alvos (Hengge, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Efetores regulados pela ligação ao segundo mensageiro diGMP cíclico (Hengae 2009, modificado)

Efetores	Exemplos	Espécie	Função regulada
Sítio de ligação a c-diGMP			
Domínio PilZ	BcsA	Várias espécies de bactérias Gram-negativas	Síntese de celulose bacteriana
	Alg44	<i>P. aeruginosa</i>	Síntese de alginato
	DgrA	<i>Caulobacter crescentus</i>	Atividade flagelar
	Plz	<i>Vibrio cholerae</i>	Expressão de genes de virulência
	YcgR	<i>E. coli</i> e <i>Salmonella spp</i>	Atividade flagelar
Domínio ativador do Sigma 54	FleQ	<i>P. aeruginosa</i>	Expressão de genes do flagelo e síntese de exopolissacarídeo
Sítio-A inativo de domínios GGDEF	PelE	<i>P. aeruginosa</i>	Síntese de exopolissacarídeo
Sítio-I de domínios GGDEF	PleD e PopA	<i>C. crescentus</i>	Ciclo celular
RNA efetores - Riboswitches	VC1722	<i>V. cholerae</i>	Biofilme e rugosidade
	Cd1	<i>Clostridium difficile</i>	Síntese do flagelo

1.9. Controle pós-transcricional pelo regulador do metabolismo de carbono (CsrA) e seu controle indireto sobre o metabolismo de c-diGMP

A proteína CsrA, também denominada RsmA (Regulador do Metabolismo Secundário), pode se ligar na sequência ACA-GGAUG, sendo GGA o motivo mais conservado, localizada próxima ou sobre o sítio de Shine-Delgarno de RNA mensageiros específicos (Timmermans and Van Melderren, 2010; Mercante *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2003). Deste modo, CsrA compete com o ribossomo para ligar-se neste sítio do RNAm, portanto, inibe a tradução de RNA mensageiros específicos (Nogueira and Springer, 2000; Dubey *et al.*, 2003; Jonas *et al.*, 2010). Em *E. coli* CsrA atua como um regulador pós-transcricional, reprimindo a biossíntese de glicogênio e formação de biofilme e ativa a glicólise e mobilidade (Dubey *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2001). Em *P. aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, CsrA regula positivamente a expressão de componentes do SST3 (Lapouge *et*

al., 2008; Brencic and Lory, 2009). No entanto, no fitopatógeno *Erwinia carotovora*, CsrA reprime a produção de fatores de virulência como pectato liase endoglucanases e proteases extracelulares (Mukherjee *et al.*, 1996; Brencic and Lory, 2009). Interessantemente CsrA de *E. coli* mostrou-se capaz de ligar-se em alguns RNA mensageiros codificadores de proteínas diguanilato ciclases. Desse modo, CsrA inibe a síntese de proteínas GGDEF, regulando indiretamente a concentração do c-diGMP na célula (Jonas *et al.*, 2008).

A deleção do homólogo de *csrA* em XCC resultou na perda completa da virulência no hospedeiro e na incapacidade de elicitar hipersensibilidade em plantas não hospedeiras. Adicionalmente, CsrA em XCC atua regulando positivamente a produção de exopolissacarídeo, endoglucanases e componentes do SST3 (Chao *et al.*, 2008). CsrA também parece ativar a dispersão celular em XCC, pois sua deleção promoveu o aparecimento de agregados celulares durante o crescimento no meio de cultura (Chao *et al.*, 2008). Algumas funções reguladas por CsrA em XCC e XOO, tais como, aumento da produção de endoglucanases, biossíntese de goma xantana e redução da agregação celular se sobrepõem ao controle realizado pela via de sinalização do *quorum-sensing* em *Xanthomonas* (Zhu *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2008). Recentemente foi demonstrado em XOO que a deleção de *csrA* reduz a expressão do gene *rpfB*, cujo produto codificado RpfB, juntamente de RpfF, atua na síntese do sinalizador do *quorum-sensing* DSF em *Xanthomonas* (Zhu *et al.*, 2011). No entanto, ainda não foi identificado em *Xanthomonas* nenhum RNA mensageiro capaz de se ligar diretamente na proteína CsrA.

1.10. Atuação do alarmônio (p)ppGpp na expressão gênica e regulação da virulência em bactérias

O alarmônio (p)ppGpp (guanosina (penta)tetrafosfato), também um segundo mensageiro bacteriano, atua alterando a expressão gênica em bactérias em resposta a carência de aminoácidos, limitações de carbono e estresses do ambiente (Potrykus and Cashel, 2008; Wu and Xie, 2009) (Figura 20).

Figura 20. Estrutura molecular do alarmônio (p)ppGpp.

As principais enzimas envolvidas no metabolismo de (p)ppGpp em bactérias são RelA, uma sintetase associada ao ribossomo, que produz (p)ppGpp durante a carência nutricional (resposta estrigente) e SpoT que pode atuar tanto como sintetase quanto hidrolase de (p)ppGpp em condições específicas, respondendo a estresses tais como limitações de carbono e carência de fosfato no meio (Vrentas *et al.*, 2008; Dalebroux *et al.*, 2010) (Figura 21). A reação de síntese de (p)ppGpp é $GTP + ATP \longrightarrow pppGpp + AMP$, enquanto a reação de sua hidrólise é $(p)ppGpp \longrightarrow GDP + PPi + Pi$ (Magnusson *et al.*, 2005). No genoma de XAC foi possível identificar os genes *relA* e *spoT*, XAC3113 e XAC3393, respectivamente (da Silva *et al.*, 2002). Entretanto, pouco é conhecido sobre a resposta de *Xanthomonas*

perante os estresses nutricionais e do meio. Não tendo sido estudado ainda o efeito da produção e sinalização de (p)ppGpp nas células de *Xanthomonas spp.*

Figura 21. A) Arquitetura dos domínios das enzimas que regulam a concentração de (p)ppGpp em bactérias. Quatro domínios funcionais foram caracterizados: (p)ppGpp sintetase (p)ppGpp hidrolase e os domínios regulatórios TGS e ACT. SpoT e RSH (Homólogo de RelA e SpoT) são enzimas bifuncionais com atividade de sintetase e hidrolase. RelA possui o domínio de hidrolase inativo apresentando somente atividade de sintetase. As atividades de SpoT/RSH e RelA são reguladas pelos domínios TGS e ACT. RelP, RelQ e RelIV são pequenas sintetases, enzimas monofuncionais, que apresentam baixa homologia de aminoácidos com o domínio sintetase de RelA e entre elas mesmas. N, região amino-terminal, e C, região carboxi-terminal da proteína. B) A atividade de SpoT é regulada através de interações com o domínio ACP (Proteína Carreadora de Ácidos graxos). Em γ -proteobactérias SpoT interage com a proteína ACP (*Acyl Carrier Protein*). A proteína ACP transfere ácidos graxos para enzimas que atuam na síntese de fosfolipídios e metabolismo secundário. A interação do domínio regulatório TGS de SpoT com ACP permite a célula monitorar seu estado de resposta severa nutricional, resultando num aumento da concentração de (p)ppGpp. Ainda não foi determinado se a interação de SpoT-ACP modula a atividade de sintetase (SD) ou hidrolase (HD) em resposta a redução de ácidos graxos na célula. Figura derivada de (Dalebroux *et al.*, 2010) com modificações.

A ligação de (p)ppGpp com a RNA polimerase na resposta estrigente ou fase estacionária, inibe a interação do *cerne* da RNA polimerase com o σ^{70} , aumentando a concentração do *cerne* da RNA polimerase livre na célula. Desse modo, o *cerne* da RNA polimerase poderá se ligar a um dos fatores sigmas alternativos σ^S , σ^{32} e σ^{54} , disponíveis durante condições de estresses e carência de nutrientes (Magnusson *et al.*, 2005).

Mutantes em várias espécies de bactérias que não produzem (p)ppGpp não conseguem responder rapidamente aos estresses do meio e por isso sua sobrevivência é comprometida. Além de aumentar a expressão de proteínas que protegem a célula bacteriana de diferentes estresses, o (p)ppGpp também ativa a expressão de genes envolvidos com a virulência em *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, e formação de biofilme em *E. coli* (Magnusson *et al.*, 2005; Dalebroux *et al.*, 2010) (Figura 22). Estudos recentes em *E. coli* demonstraram que c-diGMP e (p)ppGpp controlam a expressão de *pgaA* e *pgaD*, que atuam na síntese do exopolissacarídeo poli-1,6-N-acetilglicosamina (Poly-GlcNac) (Boehm *et al.*, 2009). A indução máxima dos genes *pgaA* e *pgaD* ocorre em resposta à redução de (p)ppGpp na célula, por ação do domínio HD fosfohidrolase de SpoT, e ao aumento de c-diGMP produzido pela diguanilato ciclase YdeH. A produção de Poly-GlcNac confere as células maior adesão a superfícies e promove o desenvolvimento de biofilme (Boehm *et al.*, 2009)

Figura 22. Resposta da célula de *E. coli* à carência de aminoácidos e limitações nutricionais. O alarmônio (p)ppGpp é produzido a partir do GTP e ATP por duas vias paralelas envolvendo SpoT e RelA em resposta a estresses. O (p)ppGpp liga-se na RNA polimerase diminuindo a transcrição de genes relacionados com o crescimento da célula e aumentando a expressão de genes envolvidos com a resistência a estresses e sobrevivência (Magnusson *et al.*, 2005).

Análise da estrutura cristalográfica do *cerne* da RNA polimerase de *Thermus thermophilus* sugeriu a presença de um sítio de ligação a (p)ppGpp ente as subunidades β e β' . No entanto, mutações sítio dirigidas em resíduos específicos das subunidades β e β' da RNA polimerase de *E. coli*, e ensaios de ligação a (p)ppGpp *in vitro* e *in vivo* nesses mutantes, mostraram que apesar de terem as sequências de aminoácidos conservadas os resíduos de ligação a (p)ppGpp nas subunidades β e β' estão localizados posições diferentes em *E. coli* e *T. thermophilus*. Adicionalmente, foi demonstrado que a ligação a RNA polimerase tem maior afinidade por (p)ppGpp em presença da subunidade ômega (ω) no *cerne* e ainda que o efeito

da interação com (p)ppGpp inibindo o processo de transcrição é maior em *E. coli* que em *T. thermophilus* (Sato *et al.*, 2009; Vrentas *et al.*, 2005b; Vrentas *et al.*, 2008).

A subunidade ômega (ω), codificada pelo gene *rpoZ*, forma um operon com *spoT* em *E. coli* (Sarubbi *et al.*, 1989; Gentry and Burgess, 1989). Os efeitos do aumento das concentrações de (p)ppGpp nas células podem ser letais para as bactérias por inibir seu crescimento, entretanto as co-regulações entre as proteínas RelA, SpoT e subunidade ômega (ω) ainda não são muito bem entendidas (Vrentas *et al.*, 2008; Chatterji *et al.*, 2007). A subunidade ω regula as concentrações de (p)ppGpp na célula de *E. coli* por ativar a expressão de RelA durante condições de estresses nutricionais (Chatterji *et al.*, 2007). Adicionalmente, a mutação de *rpoZ* em *Mycobacterium smegmatis* e *Streptomyces kasugaensis* apresenta redução da concentração de (p)ppGpp nas células, alterações da morfologia de colônia e na mobilidade e diminuição da produção de exopolissacarídeos e antibióticos (Kojima *et al.*, 2002; Mathew *et al.*, 2006). A mutação em *rpoZ* em *E. coli* parece ser suprimida por DksA, uma proteína que também interage com o *cerne* da RNA polimerase e pode aumentar a sua afinidade por (p)ppGpp (Vrentas *et al.*, 2005b).

2. Objetivos

Nos últimos anos nosso laboratório identificou interações entre proteínas envolvidas no metabolismo de c-diGMP e essenciais para regular o processo de quorum-sensing em *Xanthomonas axonopodis pv citri* (Andrade *et al.*, 2006; Guzzo *et al.*, 2009; Alegria *et al.*, 2004). No entanto, na maioria dos casos, ainda faltam informações sobre a funcionalidade destas proteínas e a importância das interações observadas sobre a óptica da fisiologia, adaptação e patogenicidade da bactéria.

Desse modo, com o intuito de caracterizar a função de várias proteínas envolvidas com a sinalização por c-diGMP e (p)ppGpp, os seguintes objetivos foram traçados:

- I- Obtenção de mutantes em *Xanthomonas axonopodis pv citri* em genes envolvidos diretamente ou indiretamente no metabolismo de c-diGMP, (p)ppGpp e *quorum-sensing*.
- II- Análise fenotípica dos mutantes através de ensaios de mobilidade em meio semi-sólido, agregação celular, produção de fatores de virulência e patogenicidade no hospedeiro.
- III- Estimativa da concentração de c-diGMP e (p)(p)ppGpp nas células dos nocautes que apresentaram alteração nos fenótipos de mobilidade biossíntese de exopolissacarídeos, produção de fatores de virulência e patogenicidade.

50mM, 2.5µL DMSO (Sigma), 1 µL de mix dNTS 10mM, 3µL do mix de oligos F e R (10 pmol/µL cada), 1µL do DNA genômico de XAC 100 ng/µL e 35 µL de H₂O milli-Q autoclavada. O programa de amplificação padronizado para todos os oligos desenhados consistia das seguintes etapas: 95⁰C/3min; 35 ciclos a 94⁰C/30s, 65⁰C/30s, 70⁰C/1min 50s; e 70⁰C/10min.

Primeiramente foram amplificados os fragmentos de 1000 pb gerados pelos pares de oligos F1-R1 e F2-R2, seguida por digestão com a enzima *NdeI* ou *NcoI*, cujo sítio se encontra somente nos oligos R1 e F2 (Figura 24). Os pares de fragmentos digeridos foram ligados por 12 horas a 16°C utilizando a enzima T4 DNA ligase (Biolabs), gerando um fragmento único de aproximadamente 2000 pb, onde se conservou entre 30-100 pb da região codificadora específica que seria deletada. Os poucos aminoácidos da região amino-terminal e da porção carboxi-terminal conservados ficaram no mesmo quadro de leitura. O fragmento de 2000 pb foi reamplificado por PCR com os oligos F1 e R2, seguido da digestão com enzimas de restrição específicas, cujos sítios se encontram nos oligos F1 e R2. Os oligonucleotídeos usados para obter as construções dos nocautes encontram-se listados na Tabela 2. Em seguida, os fragmentos de 2000 pb reamplificados foram clonados no vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen), confirmados por clivagem com endonucleases e seqüenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye *Terminator v3.1 cycle sequencing* (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. Os clones corretos foram posteriormente digeridos com enzimas de restrição e os fragmentos de 2000 pb transferidos para o vetor suicida pNPTS138. A clonagem desses fragmentos no vetor pNPTS138 foi confirmada através da clivagem com endonucleases específicas (alguns exemplos são apresentados na Figura 25).

	R2 (EcoRI) 5' CTT CGA ATT CGA CCA CAC CTT GTA CGA CGG CG 3'
XAC0494 (histidina quinase)	F1 (HindIII) 5' CCTGAAGCTTATGCTGACCGTCGACATGCCCCGAAG 3'
	R1 (NcoI) 5' GTC TCC ATG GTC AGA GCA CCG CGC TTG TGA AGT CG 3'
	F2 (NcoI) 5' GTATCCATGGACGCTCGCCTGCAAGCCGACGC 3'
	R2 (BglII) 5' CAT GAG ATC TAC CTG CAGCGA AGT GGT TGC TCG 3'
XAC0495 (GGDEF-EAL)	F1 (HindIII) 5' GCT AAA GCT TCG CCC GGA GGC ACG TTG GAC GAT C 3'
	R1 (NcoI) 5' CGC AGG AAT GAT CGA CGC GCC ATG GCG GC 3'
	F2 (NcoI) 5' GCA ACC ATG GTG CAG ACC GTC GGC AAG GAA C 3'
	R2 (BglII) 5' CGA AAG ATC TCA GAA CGT GGA GCC GCG CCC 3'
XAC0593 (GGDEF)	F1 (BamHI) 5' CGG CGG ATC CGG CGA TGC TCA CCT GCA TCG 3'
	R1 (NcoI) 5' GAT GCC ATG GGC GCT TAC GTG GCG GCT TGC TGG 3'
	F2 (NcoI) 5' GGT GCC ATG GAC GCT GGG CGC GAT CAG TGG G 3'
	R2 (XhoI) 5' CGA TCT CGA GGC GCA TCC AAC GTC GCG ACC AGA C 3'
XAC0644 (GGDEF)	F1 (HindIII) 5' GCC GAA GCT TGT GAG CGC CAC CAC CAC GCC CAC 3'
	R1 (NdeI) 5' CCG ACA CCC ATA TGC GCT CAA ACG CCC TGC TTA GAT CTT G 3'
	F2 (NdeI) 5' CGA CGC TCC ATA TGC GCG GCC ATC CGG TGA TCT GAC CTG
	R2 (SalI) 5' TCG GGT CGA CCTTGA ACA CCA CAT CGC CGG CGG CG 3'
XAC0696 (xcsE)	F (EcoRI) 5' GACAGCCAGGACGATGCGCCG 3'
	R (EcoRI) 5' CAATCTGCGCGGTCTCGGTATCG 3'
XAC1185 (SpoT-HD)	F1 (HindIII) 5' CGACAAGCTTGTGTCCACCTGCCGATGACG 3'
	R1 (NcoI) 5' GATATCCATGGCGCTGCTTTTCCCCTAGGC 3'
	F2 (NcoI) 5' GCGAGTACACCATGGACAAGCGGATATTG 3'
	R2 (HindIII) 5' CTTGAAGCTTGTGGATCTCGCCGTCGC 3'
XAC1040 (ppk)	F1 (HindIII) 5' GTTGTCAGCTTGGCGCATTGGCTGGCGGC 3'
	R1 (NcoI) 5' GGC GTG GCC CAT GGA ATC GAT CGT CAA G 3'
	F2 (NcoI) 5' GACAACGTCAGCGCCATGGTTGAGCTGGATG 3'
	R2 (HindIII) 5' GCG GCC AGA CCG GGC AAG CTT GGA TGT C 3'
XAC1330 (CYTH)	F1 (HindIII) 5' CAAGACCTTGGTCGGCTTTCGTGAAGCTTCGAC 3'
	R1 (BamHI) 5' CGG TGG ATC CAG GAA TTT GCG TTC GAT TTC TGT GG 3'
	F2 (BamHI) 5' CGTTGGATCCTTCGCATCCGTTCAAGCAGTGGAAC 3'
	R2 (HindIII) 5' CGG TAA GCT TGC GGC AGG CAT GCG TCA CAC C 3'
XAC1420 (GGDEF)	F1 (HindIII) 5' CGC CAA GCT TGT TGC CGC CGA AGG CCG CAT CGC 3'
	R1 (NcoI) 5' GGT TCC ATG GAG TCA TTG CCT ACA GTG GCC ACA AGC 3'
	F2 (NcoI) 5' CAA CGC CAT GGC GAA CCC GCG CGC GCA TTG AGC 3'
	R2 (XhoI) 5' CAT GCT CGA GGC CGG GAC TGA GGT TTC ACG ACT C 3'
XAC1486 (GGDEF)	F1 (HindIII) 5' GTTCGACCAGGAAGCTTCCTCTTCACCGGC 3'
	R1 (NcoI) 5' GGA AAA GGA ATC GCC ATG GCA TCA CTC CTA T 3'
	F2 (NcoI) 5' CTGCTGATACCCATGGAGGTGGAGTACTTCAAGC 3'
	R2 (HindIII) 5' CGG ATA AGC TTT GCA ACC AAG GAC GTG CCT GAT TC 3'
XAC1735 (hfq)	F1 (HindIII) 5' GCTGGAAGCTTGGAGAAATCGTCAGCGTCGA 3'

	R1 (NcoI) 5' CCT TAG CCA TGG AAA AAT CCT CTT CAT TAT TGT TC 3'
	F2 (NcoI) 5'CAATCCATGGCGGAAGATGACGACGTCGAGC 3'
	R2 (HindIII) 5'GAG CAA GCT TCG GCG CCT GCG ATC TTG TCG 3'
XAC1743 (<i>csrA/rsmA</i>)	F1 (EcoRI) 5' CACCTGAATTCGACTGCGCTTTGACTTCTCG 3'
	R1 (HindIII) 5' CGG CGA AGC TTG AGG ATC AAC ATT TTG CAA ATC 3'
	F2 (HindIII) 5' ATC ACG GCG ACG ATT CTT CGA AGC TTT GAT CG 3'
	R2 (EcoRI) 5' GGT TTT GGA ATT CTT GAT CCT TAC TCC TTG ATG GTC C 3'
XAC1879 (<i>rpfF</i>)	F1 (HindIII) 5' GAG CAA GCT TCC GCG CGA CAT GCC AGG TTT CG 3'
	R1 (NcoI) 5' CGT GCT CCA TGG GTT TGA TCC TGG TAA GGC CCG CG 3'
	F2 (NcoI) 5' GCG CGT CGG CCA TGG GCG TCG CTG ATT TTT GAT 3'
	R2 (BglII) 5' GCA GGA TGC CGA CAC CAC CGC CAG ATC TCC GG 3'
XAC1878 (<i>rpfC</i>)	F1 (HindIII) 5' CGA GAA GCT TAC ATC GCG CCG GAG TTG AAG GTC 3'
	R1 (NcoI) 5' CCG ATT CAT CAG CGT TTG CCG GAT CCA TGG CGA AC 3'
	F2 (NcoI) 5' CCG AGG GCG GGG CCA TGG GTA ATG GCG ATC C 3'
	R2 (BglII) 5'GAT CAG ATC TGC GTG CCC GCC GAC ATC CGC TC 3'
XAC1877 (<i>rpfG</i>)	F1(HindIII) 5' CTA GAA GCT TCA TTC ACT ACC CAC CAC AAT GCG 3'
	R1(NcoI) 5' CGG CCG GAT TCC CTA AAA CAT GCC CAT GGG CAT 3'
	R2 (NcoI) 5' GTA CCC ATG GTC GGG CGT CTG TTC GAT CCG CGT TG 3'
	F2 (BglII) 5' GCT GGA CGC TGC CCT GGT CGG TAG ATC TTG AC 3'
XAC1883 (hipotética)	F1 (BamHI) F1 5' GTA CGG ATC CGA ACT TGC CCA CCA CGC CGA G 3'
	R1 (NcoI) 5' GTT CGG CAA CGG TGG CTT CCA TGG AGC ATG CTC C 3'
	F2 (NcoI) 5' GAG ACC ATG GTG TTC GAC CTA TGA TCG CCC TGG ATT C 3'
	R2 (XhoI) 5' CCG GCT CGA GCA CAT TGA ACA CGG TGA CGG TCA G 3'
XAC1884 (hipotética)	F1 (HindIII) 5'CGCCAGGTTTTCCAGGTTCAAGCTTGGTGA 3'
	R1 (BamHI) 5' AGG ATG TCC AGC AGG ACC GAG GAT CCA AGG G 3'
	F2 (BamHI) 5' CGCGATTACTTCAAGGGTTGAAGGATCCGTCGT 3'
	R2 (HindIII) 5'CTG CGA CAC GTC CAA GCT TCG ATC GGC AAG 3'
XAC1887 (GGDEF-EAL)	F1 (EcoRI) 5' CTATGAATTCCGAGCGCGCGCCGACACCAC 3'
	R1 (NdeI) 5' CAG CAG GCG CGA TTG CAG ATA GCA TAT GAA GAA TGG 3'
	F2 (NdeI) 5' GGAAGCCTGGCATATGGACGCGCAACCGTAATC 3'
	R2 (EcoRI) 5'CGC AGA ATT CCA GGC GCT CTC GCA GCA CTA CC 3'
XAC1938 (GGDEF-EAL)	F1 (HindIII) 5' GAACGCAAGCTTGGCCGAATTGGTATCCGAG 3'
	R1 (NcoI) 5' GTTGTCCATGGTTCCGACCACCTATCCAGTTCCTAC 3'
	F2 (NcoI) 5' CTTGCCATGGTCTGAGCCGCTCACTGCC 3'
	R2 (HindIII) 5' GCATCTTGCCGCTTCGTAAGCTTGAGCAC 3'
XAC1939 (GGDEF)	F1 (HindIII) 5' GCC GAA GCT TCT CGC TCA AGG CCA CCC ACG ACG 3'
	R1 (NdeI) 5' GAT CGG CCA ACG ACA GCA ACG CAA ACA TAT GAC AAC ACC 3'
	F2 (NdeI) 5' GTT CTG TAC ATA TGG CAT GAG TCG CGC CGG CGG CCA 3'
	R2 (XhoI) 5' GAG CCT CGA GTG CTG AAA GCG GCG CGA CAG C 3'
XAC1940 (GGDEF)	F1 (HindIII) 5' GAT GAA GCT TCT GCA ACC CAG ATG GTG ATC GAT G 3'

	R1 (NdeI) 5'GCC AGC TAC ATA TGG AGC CAC GAC CTT GCA TGC AGG CG 3'
	F2 (NdeI) 5' CGA CCA CGC ATA TGC TGC CGC TGG ACA CGC TCG ATC AG 3'
	R2 (XhoI) 5' GAA CTC GAG TCG ATG GCG CAC AGC TTG CGT GCG C 3'
XAC1971 (PilZ)	F1 (HindIII) 5' GCATGGAGAAAGCTTCAGCGACCGCTACACCG 3'
	R1 (BamHI) 5' CAA TTG GAT CCA ACT GAG CGT GTC GGC AAA CAG TTC 3'
	F2 (BamHI) 5' CGATGGATCCATGATGTCTGGTTGTGGCTGCGG 3'
	R2 (HindIII) 5' GCA ACA GAC GGA TCG ACT GCA GCA AGC TTG AGG 3'
XAC1975 (fliC)	F1 (HindIII) 5' ACCGAAGCTTGCTTCTGGATTTTCAGCCGCGATG 3'
	R1 (NcoI) 5' GTT GAT TAC CTG TGC CAT GGT TTG ATT TCT CCT AAG 3'
	F2 (NcoI) 5' GGTTCATGGAGAACGTGCTGAGCCTGCTGCAG 3'
	R2 (HindIII) 5' GAG GTC GCT GAC GGT GTT GGA AGC TTG GAC GTG 3'
XAC2382 (GGDEF-EAL)	F1 (BglII) 5' GAC TAG ATC TGC AGG CCG GAA ACT GAC GTC TGT CAC 3'
	R1 (NcoI) 5' CCG AAC CAT GGC GCA CCT GAG TCA TTC CAC GTG ATC CC 3'
	F2 (NcoI) 5' GCA TCC ATG GTG ATC GCT GCA GGG TGA GTG CCG TGG G 3'
	R2 (XhoI) 5' CTG GCT CGA GCT CCC GGC TTC GGC CTG GAT G 3'
XAC2398 (GGDEF-EAL)	F1 (HindIII) 5' GAGGAAGCTTCGAGGTCCAGACCAGCCAGGG 3'
	R1 (NdeI) 5'CGT CGA CGA TCA TAT GCA GGC GGA GGG TGA GAT CTT TG 3'
	F2 (NdeI) 5'CATTCTGACATATGTCCGAATTCGTCGCCGATGCGC 3'
	R2 (HindIII) 5' CGC CAT GTT CAA CCG CAT TTT CCT AAG CTT CCT GC 3'
XAC2482 (GGDEF)	F1 (HindIII) 5' GTA CAA GCT TGG CAT CGT GCG CAT GGC CGA 3'
	R1 (NcoI) 5' CAA CAC CAT GGC CGC TGC GGT AGG ACT GCA C 3'
	F2 (NcoI) 5' CTG TCC ATG GTA TGA TCC CGC ATC GTC TGC AGG CCC3'
	R2 (XhoI) 5' CTA GCT CGA GTC ACC CGT TGC AGG TGC TGG CG 3'
XAC2492 (histidina quinase)	F1 (HindIII) 5' GGATAAGCTTGCTCGATGAGGCAGCCGTCCGC 3'
	R1 (NcoI) 5' CTG GCC ATG GTT CGT CCC TTC GCC TTG CCT G 3'
	F2 (NcoI) 5' GCTACCATGGGTGACGATGCCGACCGGATAGATC 3'
	R2 (BglII) 5' GCT GAG ATC TCA CCA GGC GCG GTT CCA GTT GTT TGC 3'
XAC2583 (gumD)	(Dunger <i>et al.</i> , 2007)
XAC2868 (EAL)	F1 (EcoRI) 5'AGCCGAATTCTAGCGTGGAAGTGGCCGAAAGCG3'
	R1 (BamHI) 5' GAG CTG GAT CCA CGC TGT CGT CCA CGA CCA GGA C 3'
	F2 (BamHI) 5' GTCTGGATCCCGACAACACGTTCCACAGCGAT 3'
	R2 (EcoRI) 5' TGC CGA ATT CGT CGA CCA CCA TGG CCT TGA TG 3'
XAC2870 (CheB)	F1 (HindIII) 5'ACAAGAAGCTTATCTGATGGCATCGCCGATG 3'
	R1 (NcoI) 5' CCGAATCGTCGACCACCATGGCCTTGATG 3'
	F2 (NcoI) 5'GTGACGCCATGGTGCAATAACGCGACAGACGTCC 3'
	R2 (HindIII) 5' GAG CGG CTC AAG CTT GCT CCC CAA G 3'
XAC2975 (ptsK)	F1 (HindIII) 5' GAT CAA GCT TCA TCC GGC GTC CCA GTG GCG C 3'
	R1 (NdeI) 5' CTT GTC GCT CAT ATG CTG GTC GAA CAG TTC GCG TGC G 3'
	F2 (NdeI) 5' GAC GCA TGC CAT ATG t AGT ATC GCG CCC TCC ACG CTG 3'
	R2 (XhoI) 5' CGC GAA TTC CAA CCT AAG AAG TAA GGC TAG CGA GCG 3'

XAC2924 (<i>pilT</i>)	F1 (HindIII) 5' CGACAAGCTTGTGTCCACCTGCCGATGACG 3'
	R1 (NcoI) 5' GATATCCATGGCGCTGCTTTTCCCCTAGGC 3'
	F2 (NcoI) 5' GCGAGTACACCATGGACAAGCGGATATTC 3'
	R2 (HindIII) 5' CTTGAAGCTTGTGGATCTCGCCGTCGC 3'
XAC3098 (<i>pilL</i>)	F1 (HindIII) 5' GATCAAGCTTACGCCGTGGACGAACTGCGCCA 3'
	R1 (BamHI) 5' TGG TGG ATC CAG ACG GTT CTT CGG CAA AAT ATT C 3'
	F2 (BamHI) 5' CTGGGCAAGCCCTACCAAGAGTTGGATCCTGATG 3'
	R2 (HindIII) 5' GAC TTA AGC TTC GGC CAA TGC CAG CGA TGC CTC C 3'
XAC3113 (<i>relA</i>)	F1 (HindIII) 5' GAACGCAAGCTTGGCCGAATTGGTATCCGAG 3'
	R1 (NcoI) 5' GTTGTCCATGGTTCCGACCACCTATCCAGTTCCTAC 3'
XAC3229 (<i>pilB</i>)	F1 (HindIII) 5' GAACGCAAGCTTGGCCGAATTGGTATCCGAG 3'
	F1 (HindIII) 5' GAACGCAAGCTTGGCCGAATTGGTATCCGAG 3'
XAC3393 (<i>spoT</i>)	F1 (HindIII) 5' GGCCACGACGTCTTGCTGGAAAGCTTGACTG 3'
	R1 (NcoI) 5' GAG ACG TCA CGA CGG TCG CCA TGG GCA G 3'
	F2 (NcoI) 5' GTCACCATGGTTCTGAAGTGATGCGCCGGCT 3'
	R2 (HindIII) 5' CAG TCA AGC TTC GTC CTG CAG CCA ATG CGG TG 3'
XAC3402 (<i>PilZ</i>)	F1 (HindIII) 5' CGCGAAgcTTGCTCAACACCGTGGCCGAGTC 3'
	R1 (BamHI) 5' GGG TGG ATC CTG GAT CAT GGC TGG GCC TCG G 3'
	F2 (BamHI) 5' GCCTGGATCCTGCCGAAGAA CAT CTA GCC GGG TAAG 3'
	R2 (HindIII) 5' GTA GGT GTG GGT GAT GTC GCT GGC GTA AGC TTC GTA T 3'
XAC3518 (<i>BcsA-PilZ</i>)	F1 (HindIII) 5' GAAGAAGCTTGCAGCGGCGATTATGTGGC 3'
	R1 (BamHI) 5' CGT GGC GCC CAG CGG ATC CAT GTT GTA GAG 3'
	F2 (BamHI) 5' CAGTGGATCCGGAGTCGTGAGTGTGATGCGT 3'
	R2 (HindIII) 5' GCT GCA GGT AAG CTT CGC TGT TGC GGC CG 3'
XAC3544 (<i>xpsE</i>)	F (EcoRI) 5' GTGATCCGGCTGGTGAACCTGGTG 3'
	R (EcoRI) 5' GCTTGGCCTGGAACCTGGTTGATGC 3'
XAC3683 (<i>histidina quinase</i>)	F1 (HindIII) 5' GTCTAAGCTTACACATGCCGTCGGACGTGCGTTTGC'
	R1 (NcoI) 5' CGCCTGCTCGCCGTAGAACACCATGGTCGA 3'
	F2 (NcoI) 5' CGTGCTGTCTGCCATGGCGGTGGAGTAAC 3'
	R2 (BglII) 5' CAACCTCGAGATCATCCGTGGCGATGGGCTTG 3'
XAC4103 (<i>rapK</i>)	F1 (HindIII) 5' ACAGCAAGCTTCCGCCCCGCGCTATCTGCTCG 3'
	R1 (NcoI) 5' GCA TCG CCG AAG CCG ACC ATG GCC AGC A 3'
	F2 (NcoI) 5' GATGCCATGGGTTGATGCCGCCTGCCGC 3'
	R2 (HindIII) 5' AGG CAA GCT TGG TGC ATG CGC CGC ATC TGG 3'

Figura 25. Confirmação da clonagem dos fragmentos de 2000 pb no vetor suicida pNPTS138 para obtenção dos nocautes. M, Marcador; 1, XAC0330; 2, XAC1878 9 (*rpfC*); 3, XAC1879 (*rpfF*); 4, XAC0258; 5, XAC0424; 6, XAC0593; 7, XAC1420; 8, XAC2382 (digestão parcial). Os clones foram digeridos com as enzimas endonucleases *EcoRI* e *HindIII* e posteriormente as reações foram resolvidas em gel 1% agarose.

3.2. Preparação e transformação de células competentes de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (306) e *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (ATCC33903)

Para realizar os diferentes ensaios, as células de XAC e XCC competentes foram preparadas utilizando 100 mL do meio de cultura *circlegrow* (Genese) com as bactérias crescidas a 28 °C até uma DO_{600nm} de 0.5. Depois de crescidas as células foram coletadas por centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm a temperatura 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com água Milli-Q autoclavada. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 20% glicerol, aliquotadas em tubos *ependorfs* e imediatamente eletroporadas com o DNA plasmidial. Para as eletroporações foram misturados 200 ng do DNA plasmidial com 200 µL de células em cubetas de 0.2 cm. A eletroporação foi realizada no equipamento Gene Pulser (BIO-RAD) na voltagem de 2.0 KV; 25 µF; 200 Ohms. As células foram recuperadas no meio 2xTY (Tryptona 1.6%, extrato de levedura 0,2%, cloreto de sódio 0,5%) por 2 horas e plaqueadas no meio seletivo.

3.3. Produção dos mutantes não polares

Um esquema que resume o processo de obtenção dos nocautes não-polares em XAC está apresentado na Figura 26. Depois de confirmada a clonagem dos fragmentos de 2000 pb no vetor suicida pNPTS138, células de XAC competentes foram eletroporadas com as construções, e selecionadas no meio LB ágar (1% de Bacto triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de Cloreto de Sódio e 1,5% ágar, pH 7.5) com canamicina 100 µg/mL. A inserção do plasmídeo pNPTS138, no genoma de XAC, durante a primeira recombinação, permitiu a seleção de colônias resistentes a canamicina e sensíveis a sacarose que possuem duas cópias do genes de interesse uma inteira e outra deletada.

Essas colônias resistentes a canamicina e sensíveis a sacarose foram crescidas a 28 °C e 180 rpm durante 12 horas no meio 2xTY contendo ampicilina 200 µg/ml. Nesta etapa não foi adicionado canamicina para permitir o segundo evento de recombinação, que consiste na saída do vetor pNPTS138 do genoma de XAC carregando a versão inteira ou deletada do gene de interesse. Após as 12 horas de crescimento, as células foram diluídas e plaqueadas no meio LB ágar suplementado com 5% sacarose e ampicilina 200 µg/mL. Depois de três dias, as colônias que cresceram neste meio foram replaqueadas e selecionadas em três diferentes condições de meio LB ágar:

Meio 1: LB-ágar + ampicilina + 5% sacarose

Meio 2: LB-ágar + ampicilina + canamicina+ 5% sacarose

Meio 3: LB-ágar + ampicilina + canamicina

O crescimento das colônias nos meios 1, 2 e 3 foi observado por dois dias. As colônias que cresceram somente no meio 1 com ausência de canamicina e na presença de sacarose devido a ocorrência do segundo evento de recombinação e a perda do vetor pNPTS138, foram selecionadas e analisadas por PCR com os oligonucleotídeos F1 e R2 que flanqueiam o gene deletado. Exemplos desta seleção são apresentados na Figura 27.

Figura 26. Esquema mostrando o processo de seleção para obtenção de mutantes não-polares em XAC, usando o vetor suicida pNPTS138. Amp, ampicilina; Can, canamicina; Sac, sacarose.

Figura 27. Confirmação das deleções nos genes de interesse por PCR de colônias submetidas às seleções nos meios LB ágar 1, 2 e 3. Os produtos de PCR das colônias de XAC foram resolvidos em gel de agarose 1% **A)** PCR com os oligos F1 e R2 (Tabela 2) das colônias selecionadas para o nocaute do gene XAC1420. Somente as colônias 6,7 e 9 apresentaram o gene XAC1420 deletado **B)** PCR de colônias selecionadas para o nocaute *cmf* (XAC0330) com os oligos F e R, que flanqueiam o gene *cmf* (Andrade *et al.*, 2006). WT, colônia selvagem; e M1-4 são colônias de XAC carregando a deleção em XAC0330. **C)** PCR com os oligos F1e R2 (Tabela 2) das colônias para o nocaute do gene XAC2382. WT, 2, 5, 6, 7 e 8, são colônias de XAC selvagem; 1,3,4,10 e 11 são colônias de XAC carregando a deleção do gene XAC2382.

3.4. Clonagem dos genes de XAC no vetor pUFR047 para complementação dos nocautes

Os nocautes que mostraram alteração nos fenótipos de mobilidade e produção de enzimas extracelulares foram complementados com a construção contendo o gene que foi previamente nocauteado clonado no vetor pUFR047 (incW Gm^r Amp^r mob⁺ Pmob lacZA⁺ par⁺) (De Feyter *et al.*, 1993) (Figura 28). O vetor pUFR047 possui origem de replicação para uma ampla gama de hospedeiros e genes que conferem resistência a ampicilina e a gentamicina.

Figura 28. Mapa do vetor pUFR047 utilizado nas complementações das cepas de XAC mutantes (De Feyter *et al.*, 1993).

Os oligos *Forward* (F) e reverso (R), que foram utilizados para gerar as construções de complementação das cepas mutantes, estão descritos na Tabela 3. Os fragmentos contendo aproximadamente 1000 pb *upstream* do primeiro códon dos genes *rpfG* (XAC1877), *clp* (XAC0483), *hfq* (XAC1735), *csrA* (XAC1743), *rpoZ* (XAC3394), *operon spoT-rpoZ* (XAC3393-XAC3394), XAC2398, XAC1971 e XAC2975 foram clonados no vetor pUFR047 usando endonucleases específicas (Tabela 3). As construções foram confirmadas com

endonucleases específicas e por reações de sequenciamento com kit BigDye (Applied Biosystems).

A preparação das células de XAC para eletroporação foi realizada conforme descrito na seção 3.2. As células competentes dos mutantes foram eletroporadas com a respectiva construção de complementação no vetor pUFR047. As colônias transformadas com a construção em pUFR047 foram selecionadas em meio LB contendo 15 µg/mL de gentamicina. A complementação do mutante XAC2398, homólogo a *fimX* de *Pseudomonas aeruginosa*, está descrita no trabalho publicado (Guzzo *et al.*, 2009).

Tabela 3. Oligonucleotídeos usados para clonagem dos genes que foram deletados no vetor de complementação pUFR047.

Gene	Oligos
XAC0483	F1 (EcoRI) 5' GGCTGTGGAATTCTCGAGGTCATCGCGTGGCG 3'
XAC0483	R (XhoI) 5' CAGTGCTCGAGGCACGTGCTGCACAGCGCC 3'
XAC1735	F1 (HindIII) 5' GCTGGAAGCTTGGAGAAATCGTCAGCGTCGA 3'
XAC1735	R (EcoRI) 5' CACGCAGAATTCCGTTATTGCTCGACGTCGTC 3'
XAC1743	F1 (EcoRI) 5' CACCTGAATTCGACTGCGCTTTGACTTCTCG 3'
XAC1743	R (EcoRI) 5' CTAACGTAAACCCCTGAATTCAACGATCAATTGGAAG 3'
XAC1877	F1 (HindIII) 5' CTAGAAGCTTCATTCACTACCCACCACAATGCG 3'
XAC1877	R (EcoRI) 5' AGAATTCCTCGAGTATTATGCTCCTGGACGCACCGA 3'
XAC1971	F1 (HindIII) 5' GCATGGAGAAAGCTTCAGCGACCGCTACACCG 3'
XAC1971	R (XhoI) 5' CTACTIONGAGTCAACGCTGGCGGCGGGC 3'
XAC2398	F1 (HindIII) 5' GAGGAAGCTTCGAGGTCCAGACCAGCCAGGG 3'
XAC2398	R (HindIII) 5' GCGGATCCCTCGAGCTTTCAGCCGAACCTCG 3'
XAC2975	F1 (HindIII) 5' GATCAAGCTTCATCCGGCGTCCCAGTGGCG C 3'
XAC2975	R (XhoI) 5' CAGCTCGAGTCATGGCGTGCGTCGCTCCAGC 3'
XAC3402	F1 (HindIII) 5' CGCGAAGCTTGCTCAACACCGTGGCCGAGTC 3'
XAC3402	R (XhoI) 5' CTACTIONGAGTTACCCGGCCAGATGTTCTTCGGC 3'
XAC3394	F1 (HindIII) 5' GGCCACGACGTCTTGCTGGAAAGCTTGACTG 3'
XAC3394	R1 (NcoI) 5' GAGACGTCACGACGGTCGCCATGGGCAG 3'
XAC3393/XAC3394	R (HindIII) 5' GGTCGAAGCTTATGGATGATCTGGGACATGGC 3'

3.5. Expressão induzida e constitutiva de genes de XAC utilizando os vetores pBRA e pMR20

Várias orfs (*open reading frames*) de XAC foram amplificadas por PCR, usando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 4. Os fragmentos amplificados foram purificados do gel de agarose 1% e clonadas em fusão ao promotor induzível por L-arabinose BAD, nos sítios de *NcoI* e *SalI* do vetor pBRA (**B**road **H**ost **R**ange **A**rabino**s**e inducible) derivado do vetor pBAD24 (Guzman *et al.*, 1995). O vetor pBRA foi produzido pela Dra. Miriam Marroquin, que clonou a origem de replicação BBR1 do vetor pBBR-RESO (MoBitec) e o gene *spc^R/str^R* de pHRP317 no vetor pBAD24 (Figura 29). As construções obtidas em pBRA foram confirmadas por digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento.

Tabela 4. Oligonucleotídeos usados para clonagem das orfs de XAC selecionadas nos vetores pBRA e pMR20.

Nome do gene	Oligonucleotídeos
Clonagem no vetor pBAD	
XAC0258	F (<i>NcoI</i>) 5' GAT ACC ATG GAT TGC CAC AAC GCC GCA GGC GCA C 3'
XAC0258	R (<i>XhoI</i>) 5' GTC CTC GAG TCA GCG GTG ACC CGA TGC AGG CGG 3'
XAC0424	F (<i>NcoI</i>) 5' GTCATGCCATGGCAGACCAGCCCGAAC 3'
XAC0424	R (<i>XhoI</i>) 5' TATAAGCTTCTCGAGTATTAATCGGCGTTGATCACCCGG 3'
XAC0483	F (<i>NcoI</i>) 5' CGCGGAAC TACCATGGGCCCAGGAAATACG 3'
XAC0483	R (<i>XhoI</i>) 5' CAGTGCTCGAGGCACGTGCTGCACAGCGCC 3'
XAC0593	F (<i>NcoI</i>) 5' GATACCATGGCATCAGCTTGCGTGCGCACGCTGC 3'
XAC0593	R (<i>XhoI</i>) 5' GTCCTCGAGTCAACACACCGCCCACTGATCGCGCC 3'
XAC1185	F (<i>NcoI</i>) 5' GATCCATGGCGCTGACGGCTGAGCCAATC 3'
XAC1185	R (<i>XhoI</i>) 5' CATCTCGAGTTACGGTTGCGCGTCCAGCC 3'
XAC1486	F (<i>NcoI</i>) 5' GATACCATGGTCCTCCACCTGCGGCGGGATTTTCG 3'
XAC1486	R (<i>XhoI</i>) 5' GTCCTCGAGTTATTCGGCAACCCGCACGCTGTC 3'
XAC1877 <i>rpfG</i>	F (<i>NcoI</i>) 5' GCCATGCCATGGAGGATGTTTTAGGGAATCCG 3'
XAC1877 <i>rpfG</i>	R (<i>XhoI</i>) 5' AGAATTCCTCGAGTATTATGCTCCTGGACGCACCGA 3'
XAC1877 HD-GYP	F (<i>NcoI</i>) 5' CGCGCGCCATGGAGTACCGCGACTC 3'
XAC1877 HD-GYP	R (<i>XhoI</i>) 5' AGAATTCCTCGAGTATTATGCTCCTGGACGCACCGA 3'
XAC1887	F (<i>NcoI</i>) 5' GATCCATGGCGCTGACGGCTGAGCCAATC 3'
XAC1887	R (<i>XhoI</i>) 5' CATCTCGAGTTACGGTTGCGCGTCCAGCC 3'
XAC2382 EAL	F (<i>NcoI</i>) 5' GGAGCGCCTGCGTGCACCATGGAGCAG 3'
XAC2382 EAL	R (<i>XhoI</i>) 5' CATCTCGAGTCACCCTGCAGCGATCAGCTTG 3'
Clonagem no vetor pMR20	
XAC1877 <i>rpfG</i>	F (<i>BamHI</i>) 5' CGTGGATCCGTATATGCAAGATGTTTTAGGGAAT 3'
XAC1877 <i>rpfG</i>	R (<i>XhoI</i>) 5' TATAAGCTTCTCGAGTATTAATCGGCGTTGATCACCCGG 3'

Figura 29. Mapa do vetor pBRA mostrando o sítio múltiplo de clonagem, a origem de replicação pBBR1 compatível com várias espécies de bactérias, gene de resistência a espectinomicina/estreptomicina, promotor BAD induzível por L-arabinose gene *araC* ativador da expressão de BAD e *mob* que permite a transferência do plasmídeo por conjugação.

A estratégia geralmente usada para promover a expressão constitutiva de um gene de interesse em *Xanthomonas spp* é fusionar a orf do gene de interesse no promotor *lac* (He *et al.*, 2007). Para isto, utilizamos o vetor pMR20, que foi gentilmente cedido pela Profa. Regina Baldini - IQ-USP. O vetor pMR20 é derivado do mini-RK2, replica em vários hospedeiros bacterianos, apresenta baixo número de cópias, confere resistência a tetraciclina, possui promotor *lac* e um sítio múltiplo de clonagem (Skerker *et al.*, 2005a) (Figura 30). A orf de *rpfG* foi amplificada com os oligos descritos na Tabela 4, clonada no vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) e transferida para o vetor pMR20 nos sítios de *Bam*HI/*Eco*RI. Utilizamos como controle a orf do gene repórter *lacZ* que estava inicialmente clonado nos sítios de *Bam*HI/*Eco*RI do vetor pUC18. A orf de *lacZ* foi retirada deste vetor com as enzimas *Bam*HI/*Eco*RI e clonada nos mesmos sítios no vetor pMR20 obtendo a construção pMR20lac::*lacZ*. A construção pUC18-*lacZ* foi gentilmente cedida pelo Prof. Frederico Gueiros, IQ-USP.

As células de XAC transformadas com as construções em pBRA e pMR20 foram selecionadas em meio LB-ágar contendo espectinomicina 200 µg/mL e tetraciclina 15 µg/mL, respectivamente. Os ensaios com as cepas transformadas foram realizados nos meios LB, 2xTY ou SB (5 g/L sacarose 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L peptona, 1 g/L ácido glutâmico, ajustar pH 7.0) suplementados com 0.3 % L-arabinose no caso de pBRA. A atividade de β-galactosidase foi confirmada na cepa selvagem transformada como a construção pMR20lac::lacZ.

Para os ensaios de super-expressão dos genes de interesse a cepa selvagem de XAC transformada com as construções em pBRA foi crescida em meio LB 1.5% ágar ou 2xTY suplementados com 0.25% (p/v) L-arabinose. A seguir, os agregados celulares e colônias rugosas foram observados na lupa Nikon modelo CD-S com um aumento de 40X e fotografadas com a câmera Nikon Coopix 995.

Figura 30. Mapa do vetor pMR20 usado para promover a expressão constitutiva de genes de interesse em XAC.

3.6. Ensaios de mobilidade

Os ensaios de mobilidade em meio Eiken 0.6% ágar foram realizados conforme descrito por Ryan *et al.* (2007). Células de XAC, crescidas em meio LB-ágar por 2 dias a 30 °C, foram inoculadas com a ponta de uma ponteira de plástico no centro da placa contendo meio Eiken ágar (8 g/L de nutriente Eiken e 6 g/L de ágar Eiken) (Eiken Chemical, Tokyo). As colônias foram incubadas por 3 dias a 30 °C para análise da mobilidade.

A mobilidade dos mutantes de XAC também foi analisada no meio SB 0,5% ágar (5 g/L sacarose 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L peptona, e 1 g/L ácido glutâmico, 5 g/L bacto ágar BD, pH 7) de acordo com Gottig *et al.* (2009). Culturas de XAC foram crescidas por 20h em meio 2xTY (Triptona 1.6%, extrato de levedura 0,2%, cloreto de sódio 0,5%) suplementado com ampicilina 100 µg/mL. A DO_{600nm} de cada cultura foi verificada e diluições em meio 2xTY foram realizadas quando necessário para igualar as DO_{600nm} das culturas. Um volume de 5 µl de cada cultura na mesma DO_{600nm} foi inoculado em placas com meio SB 0,5% ágar. As placas foram secas no fluxo por aproximadamente 30 minutos e incubadas por 3 dias a 30 °C.

Também foi verificado o efeito da super expressão das orfs descritas na Tabela 5, fusionadas ao promotor BAD, sobre a mobilidade de XAC em meio SB 0,5% ágar suplementado com 0.3% de L-arabinose. Igualmente como descrito para o meio SB, as culturas de XAC crescidas em meio 2xTY com espectinomicina 200 µg/mL tiveram sua DO_{600nm} determinadas, que em seguida foram igualadas e 5 µL de cada cultura foram inoculados em placas contendo o meio SB 0,5% ágar suplementado com 0.3% L-arabinose. As placas foram secas no fluxo e incubadas por 3 dias a 30 °C.

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão das células de XAC

Os experimentos de visualização das células de XAC, usando o microscópio eletrônico de transmissão ELMISKOP I, da Siemens, foram realizados sob a orientação do Dr. Kitajima, ESALQ-USP, Piracicaba, SP. Células de XAC foram retiradas das bordas de colônias crescidas no meio de mobilidade SB 0,5% ágar por 2 dias a 30 °C. As células foram lavadas e ressuspensas em água Milli-Q autoclavada, transferidas para redinhas de carbono, tratadas com o fixador (glutaraldeído 2,5% (v/v), paraformaldeído 2% (v/v), CaCl₂ 1 mM e tampão cacodilato 50 mM pH 7.2) e coradas negativamente com a solução 1% (p/v) de acetato de uranila.

3.8. Purificação e quantificação da goma xantana no sobrenadante de XAC

As cepas XAC selvagem e nocautes foram crescidas em 15 mL de meio 2xTY suplementado com 1% sacarose e ampicilina 200 µg/ml. A produção de goma xantana da cepa selvagem foi determinada conforme descrito em (Tang *et al.*, 1991). Para fracionar a goma xantana, o sobrenadante da cultura de XAC crescida a 30 °C até DO_{600nm} 2 foi separado das células por centrifugação a 11.000 g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon de 50 mL. Dois volumes de etanol gelado foram adicionados ao sobrenadante e depois de misturados foram estocados a -20 °C por 20h. O material precipitado foi coletado por centrifugação a 5000 rpm por 10 min, ressuspensionado em 5 mL de água destilada e 2 volumes de etanol gelado. As amostras foram centrifugadas 5 000 rpm por 10 min. O material precipitado foi seco na estufa a 65 °C e a quantidade de exopolissacarídeos da amostra foi determinada pelo seu peso seco. A quantificação da goma xantana para cada cepa foi realizada em triplicata.

3.9. Análise da expressão do operon *gum* por meio da atividade de GUS

O gene repórter (*uidA*) *gus* foi retirado do vetor binário pBI121 (Clontech) utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I (Figura 31). O fragmento de 1812 pb contendo o gene *uidA* foi purificado do gel de agarose 1% e clonado no vetor pUFR047 nos sítios de *Bam*HI e *Sst*I (Figura 28), obtendo-se a construção pUFR047*gus*.

Um fragmento de 300 pb correspondente ao promotor do operon *gum* localizado *upstream* de *gumB* (XAC2585), que corresponde ao primeiro gene do operon *gum* (XAC2585-XAC2572), foi amplificado utilizando os oligos GumBFwd (5'GATTCCATGGTGC TGTGTTGGTGGAGAACTCG3') e GumBRev (5'CATCTCGAGTCAGCTTGCCAGACGCACCTG3'). O fragmento contendo o promotor de *gumB* (XAC2585) foi purificado do gel de agarose 1% e clonado no vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen). O clone obtido foi digerido com *Bam*HI e *Sal*I liberando o promotor de *gumB*, o qual foi purificado em gel de agarose 1% e clonado nos sítios de *Bam*HI e *Sal*I da construção pUFR047*gus*. Deste modo, a construção pUFR047*gum::gus* foi obtida, onde o promotor *gum* encontra-se fusionado ao gene repórter *gus*. A construção foi confirmada por seqüenciamento.

Figura 31. Mapa de restrição do vetor binário pBI121 (Clontech). O gene da glucuronidase (GUS) foi retirado do vetor pBI121 através da clivagem com *Bam*HI e *Sac*I, e clonado nos sítios de *Bam*HI/*Sst*I do vetor pUFR047, obtendo a construção pUFR047*gus*.

A construção pUFR047gum::*gus* foi usada para transformar cepas de XAC selvagem e nocautes. Para verificar a expressão do promotor *gum* nas cepas transformadas, as células de XAC foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} 1.5, 0.2 mL de células foram coletas e transferidas para tubos *eppendorf* 2 mL, as células foram lavadas em água Milli-Q estéril e ressuspendidas em 0,8 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7, 0.1 mL de clorofórmio e 0.2 mL de uma solução 2 mM de 4-nitrofenil glucuronídeo. A reação foi incubada a 30 °C por 5 minutos, e parada com a adição de 0.4 mL de Na_2CO_3 1 M. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante foi coletado para leitura em espectrofotômetro a 420 nm. A atividade de GUS para cada cepa foi calculada em Unidade de Miller de acordo com a fórmula $U = 1000 \times [(A_{420}/(T \times V \times A_{600}))]$, onde A_{420} é o valor da absorbância do produto da reação a 420 nm, T o tempo em minutos de incubação, V o volume de células em mL e A_{600} o valor da absorbância da cultura de células a 600nm (Egener *et al.*, 2002).

3.10. Ensaios de produção de endoglucanases no sobrenadante de XAC

Culturas de XAC foram crescidas em meio 2xTY (Tryptona 1.6%, extrato de levedura 0,2%, cloreto de sódio 0,5%) suplementado com ampicilina 100 µg/mL até DO_{600nm} 2 e centrifugadas a 7 000 rpm na temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para tubos *eppendorfs*. 50 µL do sobrenadante de cada cultura foram aplicados em poços de 5 mm de diâmetro em placas contendo 20 mL de meio para ensaio [0,125% de Carboximetilcelulose (CMC), 1,5% de ágar em água Milli-Q, 50 mM de KH_2PO_4 pH 6]. As placas foram incubadas a 37 °C por 20 h, coloridas com solução de 0,1% vermelho congo por 30 min e descoloridas com uma solução 1 M NaCl. O diâmetro dos halos de degradação de CMC foi medido e a atividade de endoglucanases em cada sobrenadante foi determinada em unidades/mL, de acordo com Tang *et al.* (1991).

3.11. Ensaios de produção de proteases extracelulares por XAC

Células de XAC foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} 1. Um volume de 5 μ l de cada cultura de XAC foi inoculada no meio LB-ágar (1% de Bacto Triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de cloreto de sódio e 1,5% ágar) suplementado com 1% de leite desnatado. As placas foram incubadas por 3 dias a 30 °C. O halo de clareamento formado em volta da colônia de XAC indicou a degradação das proteínas do leite por proteases secretadas no meio de cultura (Tang *et al.*, 1991).

3.12. Quantificação de c-diGMP nas células de XAC por HPLC-MS/MS

A quantificação de c-diGMP em células de XAC foi realizada de acordo com os trabalhos que descreveram a quantificação deste nucleotídeo para *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* ((Meissner *et al.*, 2007; Simm *et al.*, 2009). A quantificação de c-diGMP foi feita para as células da cepa selvagem (wt), mutantes $\Delta rpfG$, Δclp , $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$ e mutantes complementados com a construção em pUFR047. As culturas celulares foram crescidas em 50 mL de meio 2xTY com ampicilina 100 μ g/mL ou 10 μ g/mL de gentamicina a 30 °C, 200 rpm até DO_{600nm} 1,5. As células foram coletadas por centrifugação a 5 000 rpm por 10 minutos, lavadas com 15 mL de água Milli-Q autoclavada, novamente centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de água. 10 μ M de AMP cíclico (Sigma) foram adicionados e a solução foi incubada a 100 °C por 5 minutos. O c-AMP foi utilizado como controle interno para determinar a taxa de perda durante o processo de extração. Depois de lisadas as células, cada amostra foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 15 000 rpm e em seguida foi adicionado 1 volume de isopropanol nos sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes foram centrifugados 4°C por 20 minutos a 15 000 rpm para retirada do precipitado contendo os restos celulares, e liofilizados. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 300 μ L de água e filtradas em filtros 0,22 μ m (Millipore).

Os padrões de GTP (Sigma), c-diGMP (BioLog) e c-AMP (Sigma), e as amostras foram submetidas em análises cromatográficas utilizando uma coluna C-18, Gemini, Phenomenex (250mm x 4,6mm x 5µm) acoplada a uma pré-coluna C-18, Phenomenex (4mm x 3mm). Os eluentes utilizados foram formiato de amônio 25mM (pH 7) (tampão A) e metanol (solvente B). O fluxo de 0.6mL/min e o método (2% de B até 7 min, de 2% a 80% de B até 17 min, 80% de B até 25 min, 80% a 2% de B até 35 min minutos e 2% de B até 40 min) permitiu a separação dos padrões GTP, c-diGMP e cAMP.

Durante a quantificação as frações correspondentes ao tempo de retenção do c-diGMP e cAMP no HPLC foram coletadas, e as análises para confirmar suas identidades químicas e as áreas dos picos de cada molécula nas amostras foram feitas em um espectrômetro de massas Micromass, modelo Quattro II, acoplado a um cromatógrafo líquido de alta desempenho (HPLC), Shimadzu do laboratório do Prof. Dr. Paolo Di Mascio, IQ-USP. As áreas dos picos do cAMP obtidas no espectrômetro de massas foram usadas para calcular a perda durante o processo de extração, com base na curva padrão de concentrações conhecidas do cAMP. De mesmo modo, as áreas obtidas no espectrômetro de massas para o c-diGMP permitiram calcular a concentração de c-diGMP nas células de XAC, através da fórmula gerada a partir da curva com diferentes concentrações conhecidas do padrão c-diGMP. O experimento foi realizado em triplicada e as médias das concentrações de c-diGMP para cada amostra calculada.

O equipamento HPLC possui duas bombas LC-10Advp, um detector UV/visível SPD-10Advp, um injetor manual Rheodyne um forno de controle de temperatura de coluna cromatográfica CTO-10Avp e uma controladora do sistema SCL-10Avp. O espectrômetro de massas possui uma interface de ionização a pressão atmosférica (API) com fonte *Z-spray* e probes para ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI). A configuração do espectrômetro de massas é do tipo triplo quadrupolo (Q1, Q2,

Q3), sendo que dois quadrupolos são analisadores (Q1 e Q3) e o quadrupolo intermediário (Q2) é uma câmara de fragmentação por colisão com moléculas de argônio. Esta configuração permite análises de espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS), podendo obter-se espectros de massas de um íon pai selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e um segundo espectro de massas do íon filho, após a fragmentação do íon pai com moléculas de argônio na câmara de colisão (Q2). A fragmentação de um íon precursor com moléculas de argônio permite a obtenção de espectros de massas de íon pai (*Parent*) e filhos (*Daughters*), além de espectros de massas através do monitoramento de múltiplas reações (MRM), permitindo a análise quantitativa do íon precursor. O HPLC e o espectrômetro de massas são controlados via microcomputador utilizando o programa MassLynx 3.2.

As amostras foram analisadas por HPLC-MS/MS no modo de ionização *electrospray negativo* (ESI) e modos de detecção *full scan* (faixa de m/z de 100-700), *daughters* e MRM. As condições de ionização foram: voltagem do capilar de 3,5kV, voltagem do cone de amostragem de 30V, voltagem do cone extrator de 10V, energia de colisão de 50eV, temperatura da fonte igual a 100°C e temperatura de dessolvatação de 200°C. A separação e análise das amostras no HPLC-MS/MS foram realizadas com a ajuda da técnica Fernanda Prado, no laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ-USP.

3.13. Teste de patogenicidade e curva de crescimento das cepas de XAC em laranja pêra

Alguns dos testes de patogenicidade dos mutantes produzidos foram realizados em colaboração com o Dr. Alexandre Amaral, Laboratório de Biotecnologia Centro APTA de citricultura "Sylvio Moreira", e pelo Dr. Júlio Oliveira UNIFESP Diadema/UNESP de Jaboticabal. Os ensaios de inoculação foram feitos em plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck crescidas em casa de vegetação com temperatura mantida a 28 °C. Outros testes foram conduzidos na sala de vegetação do IQ-USP mantida a 28 °C e luminosidade 12h/dia.

Culturas de XAC selvagem (WT) e mutante foram crescidas até DO 600_{nm} 1 em meio 2xTY contendo 100 µg/mL de ampicilina. As culturas crescidas foram ajustadas para uma DO 600_{nm} 0.3 e inoculadas na parte abaxial de folhas de laranja pêra utilizando seringas descartáveis de 1 mL. Os fenótipos característicos do desenvolvimento do cancro cítrico (encharcamento, hiperplasia, clorose e necrose) foram acompanhados diariamente após as inoculações. As folhas inoculadas foram fotografadas após 10 dias do início da infecção.

As curvas de crescimento dos mutantes $\Delta rpfG$, Δclp , $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$ foram realizadas em plantas crescidas em casa de vegetação com temperatura mantida a 28 °C. Para monitorar o crescimento das cepas de XAC no hospedeiro, culturas da bactéria foram crescidas em meio 2xTY com ampicilina 100 µg/mL por 20 horas a 30 °C. A DO_{600 nm} das culturas foram ajustadas para 0.3 e a inoculação foi realizada com agulha de seringas de 1 mL descartáveis. As bactérias foram inoculadas na superfície abaxial de folhas jovens dentro de uma área de aproximadamente 2,5 cm². As inoculações foram realizadas em triplicatas em cada folha para as cepas de XAC selvagem (Wt), nocautes *rpfG*, *clp*, *csrA* e *rpoZ* e nocautes complementados com a construção em pUFR047. Discos com área de 10 mm² foram removidos das folhas inoculadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 9 e 12 dias após inoculação e macerados em 1 mL de 0.85% NaCl. Diferentes diluições dos macerados foram realizadas em solução 0.85% NaCl e plaqueadas no meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 30 °C e após 2 dias de crescimento o número de colônias em cada placa foi determinado.

3.14. Ensaios de interação proteína-proteína com o sistema de dois híbridos

As orfs das proteínas GGDEF XAC0258 e XAC0424, e genes *pilZ* (XAC1971, XAC3402 e XAC3518) foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de XAC com os oligonucleotídeos indicados na Tabela 5. O método de amplificação por PCR foi [94°C/3min; 5 ciclos a (94°C/30s; 50°C/30s; 72°C/1min 50s); 25 ciclos a (94°C/30s; 60°C/30s; 72°C/1min50s); 72°C/10min]. O produto de PCR foi clivado com as enzimas *NcoI/XhoI* e

inserido no vetor pOBD (Uetz *et al.*, 2000) nos sítios de *NcoI/SalI* (Figura 32). As construções foram confirmadas usando enzimas de restrição e por sequenciamento.

Tabela 5. Orfs clonadas no vetor pOBD para ensaios de duplo híbrido.

Orfs	Oligos
XAC0258	(NcoI) F 5' gataccatggattgccacaacgccgagggcag 3' (XhoI) R 5' gtcctcgaggcggtgacccgatgcagggcg 3'
XAC0424	(NcoI) F 5' gtcattccatggcagaccagcccgaaac 3' (SalI) R 5' tataagctctcgagtattaatcggcggtgatcccccgg 3'
XAC1971	(NcoI) F 5' gataccatgggcgcgctcggcacctcg 3' (SalI) R 5' ctactcgagtcaacgctggcgggcgggc 3'
XAC3402	(NcoI) F 5' gataccatggtcaggacacccggcgcg 3' (SalI) R 5' ctactcgagttacccggcagatgttcttcggc 3'
XAC3518	(NcoI) F 5' ttgcaaccgccagcgaaccatggcccag 3' (SalI) R 5' cagctcgagatgtcaggcgcgcggaaggt 3'

A linhagem de *Sacharomyces cerevisiae* PJ69-4a (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 dois híbridos (James *et al.*, 1996). A metodologia de transformação foi realizada segundo o protocolo descrito por Alegria *et al.* (2004), utilizando uma biblioteca de XAC clonada no vetor pOBD (Figura 32).

Figura 32. Mapa dos Vetores binários pOBD e pOBD (Uetz *et al.*, 2000) usados para identificar interações proteína-proteína em sistema de dois híbridos. **A)** vetor pOBD possui a marca de seleção *LEU2* e a porção do gene que codifica a ativação da transcrição (AD) de Gal4 e **B)** vetor pOBD-2 apresenta o domínio de ligação a DNA (DBD) de Gal4 e a marca de seleção *TRP1*.

A partir da composição básica do meio de cultura SC [bases nitrogenadas de leveduras sem aminoácidos 0.66%, glicose 2%, mistura de aminoácidos acrescida de adenina e uracila 0,083%, ágar bacteriológico (somente para meio sólido) 1,6% e pH 5,6] diversas variações foram feitas de acordo com o tipo de seleção desejada, variando os componentes da mistura de aminoácidos acrescida de adenina e uracila (m/m: Ade 5%; Arg 5%; His 5%, Ile 5%; Leu 10%; Lys 5%; Met 5%; Phe 8%; Ser 5%; Thr 5%; Trp 8%, Tyr 5%; Ura 3% e Val 23,5%). As combinações obtidas foram: SC-Trp (sem triptofano), SC-Leu (sem leucina), SC-Trp-Leu-His (sem triptofano, leucina e histidina) e SC-Trp-Leu-His-Ade (sem triptofano, leucina, histidina e adenina).

Anteriormente ao ensaio de duplo híbrido foram realizado testes de auto-ativação em SC-Trp-His para determinar a concentração ótima de 3 amino-triazol (3-AT), um inibidor competitivo na biossíntese de histidina, a ser utilizada na triagem. Nestes ensaios foram usados 5 mM de 3 amino-triazol para todas as construções em pOBD.

Células PJ69-4a, previamente transformadas com as construções em pODB, foram inoculadas em 50 mL de meio SC-Trp e incubadas 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 $7,5 \times 10^8$ células, as quais foram centrifugadas, inoculadas em 150 mL de meio YAPD [extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, adenina 0,008% e ágar bacteriológico (somente para meio sólido) 1,6%] e incubadas a 30°C por aproximadamente 4h, sob agitação. Depois deste período foi medida a absorbância em OD_{600nm}, a qual deve atingir um valor de 2, o que corresponde a aproximadamente $2,0 \times 10^7$ UFC/mL.

A cultura foi então dividida em três tubos Falcon de 50 mL e centrifugada a 1500 g por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas em 25 mL de água estéril. Em seguida elas foram ressuspensas em um único tubo com 3 mL de acetato de lítio (100 mM). A solução foi incubada a 30°C por 15 min, em banho-maria.

Após esse período a solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao “pellet” foram adicionados os seguintes componentes: 7,2mL PEG 50%; 1,08mL acetato de lítio 1,0M; 1,5mL DNA espermatozoides de salmão (2mg/mL); 30 µL da biblioteca genômica de XAC (1µg/µL) e 970 µL H₂O. A biblioteca contendo os genes de XAC clonados no vetor pOAD foi produzida e testada por Alegria *et al.* (2004). 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 min corridos. Após este procedimento, a mistura foi submetida ao choque-térmico a 42 °C durante 45 min. No decorrer do tempo, o tubo era invertido a cada 5 minutos. Posteriormente ao choque-térmico, a mistura foi centrifugada a 1500 g por 5 minutos e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 10 mL de água ultrapura estéril e foram plaqueados 700 µL da solução em 14 placas (150x15mm) contendo meio SC-Trp-Leu-His + 3mM 3-AT. Em outra placa contendo SC-Trp Leu, foram plaqueados 100 µL de uma diluição 1:100 da mistura (controle para calcular o número de transformantes totais). As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias

Os clones positivos (cresceram em meio SC-Trp-Leu-His + 3mM 3-AT) obtidos através do ensaio de dois híbridos foram repicados em placas contendo meio SC-Trp-Leu-His-Ade + 3-AT e incubados a 30°C por 4 dias. Os clones que cresceram no meio seletivo e apresentaram coloração branca eram considerados positivos, pois foram capazes de ativar simultaneamente os genes repórteres GAL2-ADE2 e GAL1-HIS3.

O DNA plasmidial foi isolado das leveduras de acordo com Sambrook, *et al.* (2000), e utilizado na eletroporação de células de *E. coli* KC8 (*hsdR*, *leuB600*, *trpC9830*, *pyrF::tn5*, *hisB463*, *lacDX74*, *strA*, *galU,K*). Os clones contendo pOAD foram selecionados em meio M9/glicose-Leu [1x solução de sais M9 (60g/L Na₂HPO₄; 30g/L KH₂PO₄; 10g/L NH₄Cl; 5g/L NaCl) 0.2% glicose; 1mM MgSO₄; 0.1 mM CaCl₂; 32mg/L Trp; 16mg/L His; 16mg/L uracil; 1.2% ágar] contendo 100µg/mL de carbenicilina, e o DNA plasmidial desses clones foram

isolados para serem seqüenciados. O sequenciamento seguiu o protocolo “save money”, sugerido pela Applied Biosystems (Big Dye Terminator vs. 3.0). Foi utilizado oligonucleotídeo de iniciação que hibridizam no sítio múltiplo de clonagem, “forward” (5’cagggatgtttaataccactacaatg 3’). A análise das seqüências foi realizada com base ao banco de dados do genoma de XAC (Silva *et al.*, 2002).

3.15. Análise de interações do domínio HD-GYP com presas GGDEF em levedura

Em colaboração com o Dr. Robert Ryan e Dr. Max Dow (Biomerit Institute, University College of Cork, Irlanda) propusemos estudar melhor a interação do domínio HD-GYP da proteína RpfG com presas isoladas da biblioteca de XAC, proteínas com domínio GGDEF, previamente descritas no trabalho publicado pelo nosso grupo (Andrade *et al.*, 2006). O Dr. Robert Ryan clonou no vetor pOBD a região codificadora do domínio HD-GYP de RpfG de XCC e também suas variantes com os resíduos do motivo HD-GYP substituídos por alaninas (Ryan *et al.*, 2010a). As construções obtidas permitiram testar se o domínio HD-GYP de XCC seria capaz de interagir com as presas identificadas na biblioteca de XAC, que mostraram interagir com o domínio HD-GYP de XAC. A Figura 33 resume as construções utilizadas nestes ensaios.

Cada interação testada foi analisada por contagem do número de colônias crescidas no meio seletivo SC-Trp-Leu-His-Ade + 3-AT (ver seção 3.15) e a atividade do gene repórter da beta-galactosidade foi calculada em unidades de Miller, seguindo o protocolo padrão do substrato ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) (Ryan *et al.*, 2010a).

Figura 33. No círculo estão representadas as construções com o domínio HD-GYP da proteína RpfG de XAC e XCC, que foram clonados no vetor pOBD, e utilizadas para transformar a levedura PJ694a a fim de verificar a interação com proteínas GGDEF, representadas no quadrado. As orfs que codificam as proteínas diguanilato ciclases estão clonadas no vetor pOAD, e foram previamente descritas no trabalho Andrade *et al.* (2006). XAC1887 possui ambos os domínios GGDEF e EAL e foi usada como controle negativo.

3.16. Ensaio com sistema de dois híbridos para confirmar a interação entre XAC3402 e o domínio EAL de XAC1938

Na busca de alvos que interagem com as proteínas PilZ de XAC, a construção de XAC3402_{PilZ(1-115)} clonada no vetor pOBD foi utilizada como isca contra a biblioteca de XAC clonada no vetor pOAD (seção 3.14, Fig. 32). Alguns clones que interagiram com XAC3402_{PilZ(1-115)} foram seqüenciados sendo que dois deles tiveram suas identidades confirmadas para o domínio EAL₆₃₆₋₆₉₅ de XAC1938. Para verificar se esta interação é verdadeira, as construções contendo o domínio XAC1938EAL₆₃₆₋₆₉₅ clonado no vetor pOAD (pOAD-XAC1938_{EAL}) e pOBD-XAC3402_{PilZ} foram utilizadas para transformar a levedura PJ69-4a. Os ensaios para confirmar a interação foram realizados em diferentes meios seletivos SC-Trp, SC-Leu e SC-Trp-Leu-His-Ade.

3.17. Clonagem e expressão heteróloga das proteínas recombinantes XAC0424, XAC0483 (*clp*), XAC1185, XAC1743 (*csrA*), XAC1971

As orfs XAC0424, XAC0483 (*clp*), XAC1185, XAC1743 (*csrA*) e XAC1971 foram amplificadas a partir do DNA genômico de XAC por PCR. A reação de PCR foi realizada da seguinte forma: 95°C/4min; 35 ciclos a (95°C/30s; 65°C/30s; 70°C/1min); 72°C/10min]. Os fragmentos amplificados foram purificados do gel de agarose 1% (Kit Invitrogen). Os oligonucleotídeos utilizados nas amplificações estão descritos na Tabela 6.

No caso de XAC0424 e XAC1185, os fragmentos foram purificados e em seguida clivados com as enzimas *NcoI/XhoI* e clonados nos mesmos sítios do vetor pROEX-b (Invitrogen) (Figura 34A). A orf *csrA* (XAC1743) purificada do gel de agarose foi digerida com *NdeI* e *EcoRI* e clonada nos mesmos sítios do vetor pET28a (Fig. 34B). Já os fragmentos amplificados das orfs *clp* (XAC0483) e XAC1971 foram clonadas nas extremidades contendo timina do vetor pETSUMO (Invitrogen) (Fig. 34C). Todas as construções foram confirmadas por clivagem com endonucleases e sequenciamento. As construções obtidas foram usadas para transformar a cepa de *E. coli* BL21(DE3). A expressão heteróloga dessas proteínas foi induzida em bactérias crescidas no meio 2xTY com adição de 0.5 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) na cultura com a DO_{600nm} 0.5. A indução ocorreu por um período de 4 horas a 30 °C.

Figura 34. Mapa dos vetores utilizados para expressão heteróloga das proteínas de XAC em *E. coli* BL21(DE3). **A)** pROEX-HTb (Invitrogen), **B)** pET28a+ (Invitrogen) e **C)** pET SUMO (Invitrogen).

Tabela 6. Oligonucleotídeos usados na clonagem de orfs de XAC em vetores de expressão heteróloga.

Orf	Oligos	vetor	Proteína recombinante	Massa Molecular
XAC0424	F (NcoI) 5'gtcatgccatggcagaccagcccggaac 3' R (XhoI) 5'tataagctctcgcagtattatcgccgttgatcaccgg 3'	pROEX-b	6HisXAC0424	62.1 KDa
XAC0483 (<i>clp</i>)	F 5'ctagtaccgcgcggaagcatgagcccgaaata 3' R (XhoI) 5'cagtgtcgcaggcacgtgctgcacagcgcc 3'	pETSumo	6HisSumoClp	35.82 KDa
XAC1185	F (NcoI) 5'gccatgccatggaggatgttttagggaatccg 3' R (XhoI) 5'agaattcctcgcagtattatgctctggacgcaccga 3'	pROEX-b	6HisXAC1185	25.1 KDa
XAC1743 (<i>csrA</i>)	F (NdeI) 5'gagatttgcaaacatatgttgatcctcactcgccg 3' R (EcoRI) 5'ctaactgaacccttgaattcaacgatcaattggaag 3'	pET28a	6HisCsrA	12 KDa
XAC1971	F (NcoI) 5'gataccatgggcgcgtggacactcg 3' R (XhoI) 5'ctactcgagtcaacgctggcggcgggc 3'	pETSumo	6HisSumoXAC1971	34.16 KDa

3.18. Purificação da proteína recombinante 6HisXAC0424 e análise da sua atividade diguanilato ciclase

Após a indução da proteína recombinante 6HisXAC0424 na cepa BL21(DE3) com 0.5 mM de IPTG, as bactérias foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas no tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl e 50 mM imidazol) e rompidas no *French Press* sob pressão 20,000 psi na mini-célula e fluxo de 22-25 gotas/min. O lisado bacteriano foi centrifugado a 16000 rpm por 40 min a 4 °C e transferido para um tubo falcon. Utilizando um sistema FPLC (fast protein liquid chromatography – Akta GE), o sobrenadante foi aplicado numa coluna de 5 mL Ni²⁺-sepharose (GE Healthcare Life Science) equilibrada com tampão A. Após a lavagem com 10 volumes de coluna, seguiu-se para a eluição com 5 volumes do tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl e 500 mM imidazol). As frações eluídas da coluna foram coletadas e posteriormente analisadas em gel SDS-PAGE 15% acrilamida.

Um volume de 10 mL das frações contendo 6HisXAC0424 foram aplicados na coluna de gel filtração Superdex-200 de 320 mL e resolvidos no tampão (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA e 14 mM 2-mercapetanol). Em seguida a presença de 6HisXAC0424 nas frações eluídas foi confirmada por gel SDS-PAGE 15% acrilamida. A proteína recombinante 6HisXAC0424 foi dialisada contra o tampão (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 5 mM 2-mercaptoetanol) e aliqüotada em 20% glicerol.

A atividade de diguanilato ciclase de 6HisXAC0424 foi testada no tampão (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoetanol), utilizando 300 mM GTP como substrato e 2.3 mM de 6His XAC0424 purificada. Os produtos da reação foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, Shimadzu), com ajuda da técnica Fernanda Prado, no laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ-USP.

Os padrões GTP (Sigma) e c-diGMP (BioLog) e os produto da reação com 6HisXAC0424 foram analisados por HPLC-MS/MS no laboratório do Prof. Paolo Di Mascio com o auxílio da técnica especialista Fernanda Prado. As condições de análise aplicadas ao HPLC e espectrômetro de massas estão descritas na seção 3.12.

3.19. Expressão heteróloga e purificação de 6HisSumoClp (XAC0483)

O gene XAC0483, que codifica a proteína Clp, foi amplificado usando os oligos XAC0483F e XAC0483R descritos na Tabela 6. O oligo XAC0483F criou um sítio de clivagem para trombina anterior ao códon inicial de tradução de Clp. O fragmento amplificado foi purificado do gel de agarose 1%, e clonado no vetor de expressão pETSUMO (Invitrogen), produzindo o clone 6HisSumoClp. A proteína recombinante foi induzida na cepa BL21(DE3) utilizando 0.5 mM de IPTG, e purificada em coluna de Ni⁺². A proteína 6HisSumoClp purificada foi clivada com trombina (Sigma) para remover a proteína SUMO fusionada. Produtos da digestão com trombina foram resolvidos em coluna de gel filtração Superdex 200, permitindo obter frações de Clp pura. A proteína Clp purificada foi quantificada, e aliqotada em 20% glicerol para ensaios de ligação a DNA (EMSA).

3.20. Ensaio para verificar mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) na interação de Clp com o promotor do SST2 *xcsC*

Uma região de 110 pb contendo um possível sítio de ligação de Clp no promotor de *xcsC* (XAC0644), primeiro gene do *operon* do SST2 *xcs*, foi amplificada a partir do DNA genômico de XAC, utilizando os oligos F 5'CGTGGATCCGTATATGCAAGATGTTTTAG GGAAT 3' e R 5'CCGATGACACAGAC CGACACACG 3'. Também foi amplificado com os oligos F 5'CCGTGGCTATTTC TGGTTGTC 3' e R 5'GACCACTTCCACGCTCAATTG 3' um fragmento de 115 pb correspondente a uma porção do gene XAC3640, sendo este usado como controle negativo no ensaio. Ambos os fragmentos foram purificados do gel de

1% agarose e marcados na extremidade 3' com dioxigenina-11-ddUTP usando o Kit DIG GEL-SHIFT 2nd GENERATION (Roche).

Para cada reação de interação foram misturados 1 μ M da proteína Clp purificada, 0,2 μ g de ssDNA (Sigma), 2 μ L (15 ng) de DNA marcado em tampão (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 μ g/mL de BSA para um volume total de 20 μ L de reação). Para verificar o efeito de c-diGMP sobre o complexo Clp-promotor *xcsC* foram adicionados 50 μ M de c-diGMP ou como controle 50 μ M de c-AMP. As reações foram incubadas por 20 minutos a 28 °C e colocadas no gelo. Foram adicionados 5 μ L de azul de bromofenol (5X). As reações foram resolvidas por eletroforese em gel 6% acrilamida não desnaturante com o tampão TBE (0.5X) a 60 volts. O complexo Clp-DNA foi transferido para membrana hybond-N+ (Amersham) em presença do tampão TBE (0.5X), utilizando sistema semi-seco ("Trans Blot semi-dry transfer cells", Bio-Rad) a 400 mA por 1 hora. Ao término da transferência a membrana foi exposta a luz ultravioleta com o UV-Crosslinker 120 mJ por 1 minuto. A membrana foi lavada, bloqueada, e incubada com anticorpo anti-dioxigenina e o componente revelador que acompanha o Kit DIG Gel-Shift (Roche), seguindo as instruções do fabricante. A membrana foi exposta ao filme fotográfico (Kodak) por 20 minutos e revelada.

3.21. Crescimento de XAC em meio mínimo com inibidor da via de síntese de histidina

O crescimento das cepas de XAC selvagem, mutantes $\Delta rpoZ$, $\Delta relA$, $\Delta rpoZ\Delta relA$ e $\Delta rpfG$, e a complementação de $\Delta rpoZ$ foram analisadas em meio mínimo (15 mM MOPS pH 7, 0.3% glicose 250 μ M NaH₃PO₄, 32mg/L Trp; 16mg/L Leu; 16mg/L uracil; 10 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 1mM NH₄Cl, 5 mM FeSO₄) contendo 100 μ g/mL de ampicilina com diferentes concentrações (0, 200mM, 300 mM e 400 mM) de 3-amino triazol (3-AT), um inibidor da via de biossíntese de histidina.

3.22. Análise do acúmulo de (p)ppGpp em células de XAC por cromatografia de camada delgada (CCD)

O experimento foi realizado de acordo com o trabalho (Spira and Ferenci, 2008), que promove o acúmulo de (p)ppGpp em *E. coli* mimetizando a carência de aminoácidos no meio. As cepas de XAC foram crescidas por 16h em meio 2xTY. As culturas foram centrifugadas, e as células lavadas com meio mínimo (15 mM MOPS 7, 0.3% glicose 250 μ M K_2HPO_4 , 32 mg/L Trp; 16mg/L Leu; 16 mg/L His, 16mg/L uracil, 10 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 1mM NH_4Cl , 5mM $FeSO_4$) e diluídas para DO_{600nm} 0.3 no mesmo meio mínimo contendo adicionalmente 200 μ M de P^{32} e antibióticos adequados. No caso dos ensaios realizados com as cepas selvagem e nocaute de *rpoZ*, para promover a super expressão de XAC1185, clonado no vetor pBRA, foram adicionados 0.3% L-arabinose ao meio mínimo, e no experimento controle foram adicionados 0.3% D-glicose ao invés de L-arabinose.

As células foram crescidas por 4 horas o meio mínimo, alíquotas de 20 μ L de cada cultura foram coletadas, e misturadas com 10 μ L ácido fórmico 11 M e mantidas no gelo. A seguir para promover o estresse de carência de aminoácidos adicionou-se 1 mg/mL de serina hidroxamato em cada cultura. Após induzir o estresse por 25 minutos, alíquotas de 20 μ L de cada cultura foram retiradas, misturadas com 10 μ L ácido fórmico 17 M gelado, e colocadas no gelo.

Para analisar o acúmulo de (p)ppGpp por CCD, um volume de 10 μ L de cada amostra foram aplicados 1 cm acima do início da folha de CCD-celulose 20x20cm (Merck). A distância entre cada amostra aplicada na folha foi de 1 cm. As amostras aplicadas na folha CCD-celulose foram resolvidas em tampão 1.5 M K_2HPO_4 pH 3,5. A folha de CCD-celulose foi seca e exposta ao filme fotográfico. O filme sensibilizado foi então revelado depois de 4 e 12 horas de exposição.

Estes ensaios foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Beny Spira do Depto. Microbiologia-ICB/USP.

3.23. Mutação sítio dirigida nos genes de XAC1971 (PilZ) e XAC1185 (HD-SpoT)

Substituições dos resíduos R73L e K77I na orf de XAC1971 clonada nos vetores pETSumo e pUFR047, e do resíduo D58A na orf de XAC1185 clonada no vetor pBRA, foram produzidas utilizando o kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), seguindo as instruções do fabricante. Os oligos utilizados para produzir as mutações estão descritos na Tabela 7. As mutações nos respectivos clones foram confirmadas por sequenciamento.

Tabela 7. Oligonucleotídeos usados para gerar mutações sítio dirigidas.

Gene	Oligos
XAC1971	F 5' CTGCTGGTGCAGCTCATGGACGCCATACTGGATTGATGCTGG 3'
XAC1971	R 5' CCAGCATCAAATCCAGTATGGCGTCCATGAGCTGCACCAGCAG 3'
XAC1185	F (NcoI) 5' GATTCCATGGAACCAGATCTCCAGGCCGCC 3'
XAC1185	R (XhoI) 5' GATCTCGAGTCAATGCGCGCGCGGGTTC 3'

3.24. Expressão e purificação de 6HisCsrA (XAC1773), 6HisXAC1185 e 6HisSumoXAC1971_{PilZ} em *E. coli*

As orfs de *csrA* (XAC1743), XAC1185 e XAC1971 foram amplificadas e clonadas em vetores de expressão heteróloga (ver seção 3.17, Fig. 34). A expressão das proteínas recombinantes 6HisCsrA, 6HisXAC1185 e 6HisSumoXAC1971 foram induzidas na cepa BL21(DE3) com 0.5 mM IPTG em culturas de bactérias crescidas a 30⁰C até DO_{600nm} 0.5. A indução foi realizada por 4 horas nessas condições. As proteínas recombinantes apresentaram-se na forma solúvel no tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM NaCl e 25% Sacarose) após a lise celular em French-Press com pressão de 20 000 psi na mini-célula e fluxo de 25 gotas/min.

Cada uma das proteínas recombinantes foi expressa e purificada separadamente por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose Ni⁺² no FPLC com fluxo de 1 mL/min. Uma coluna de 3 mL de “Chelating Sepharose Fast flow” (Amersham Biosciences) foi lavada com 3 volumes de água, e ativada com 3 volumes da solução 100mM de NiSO₄. A coluna foi novamente lavada com 5 volumes de água e equilibrada com 5 volumes do tampão B (50mM

de Tris-HCl pH 8, 5mM de imidazol, 100mM NaCl). Um volume de aproximadamente 10 mL do sobrenadante proveniente da lise de 500 mL de meio de cultura induzida por IPTG, foi aplicado na coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes do tampão C (50mM de Tris-HCl pH 8, 50mM de imidazol, 100mM NaCl). As proteínas com cauda de histidina (6His) foram eluídas com tampão D (50mM de Tris-HCl pH 8, 500 mM de imidazol, 100mM NaCl). Frações de 0.6 mL eluídas foram coletadas em tubos de eppendorfs 2 mL. Depois de terminada a eluição, a coluna foi lavada com 5 volumes de água e 5 volumes de etanol 70%, então armazenada a 4⁰C.

Um volume de 8 mL das amostras eluídas da coluna de afinidade foi aplicado a uma coluna de gel filtração Superdex 200 de 315 mL (Amersham) com fluxo de 0.8 mL/min utilizando o tampão E (50 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA e 14 mM 2-mercaptoetanol). Em seguida, as frações coletadas foram dialisadas a 4⁰C sob agitação no tampão E (50 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA e 14 mM 2-mercaptoetanol). As proteínas 6HisCsrA, 6HisXAC1185 e 6HisSumoXAC1971 purificadas foram aliquotadas em 20% glicerol e armazenadas a -20 ⁰C.

Amostras das proteínas recombinantes purificadas e dialisadas foram resolvidas em gel de acrilamida 15% para confirmar a pureza e estabilidade. A proteína 6HisSumoXAC1971 apresentou um peso molecular menor que o esperado, por isso sua identidade foi confirmada por espectrometria de massas MALDI-TOF (Amersham) com o auxílio da técnica especialista Izaura Toma no laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ-USP.

3.25. Extração de RNA das células de XAC

Culturas de XAC selvagem e mutante com a deleção no gene *cmf* (XAC0330) foram crescidas em 5 mL de meio 2xTY até DO_{600nm} 1, centrifugadas a 4⁰C em 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de Trizol (Invitrogen). O RNA total das células foi extraído seguindo as especificações do fabricante.

Após a extração o precipitado de RNA total foi ressuspensionado em água milli-Q tratada com DEPC (1mL/L) e autoclavada. A qualidade e concentração do RNA extraído foram verificadas utilizando o NanoDrop ND-1000. Aproximadamente 3 µg de RNA total de cada amostra foram aplicados em gel desnaturante 1,2% agarose e 6% formaldeído em 1X de tampão MOPS (0.2 M MOPS pH 7, 20 mM acetato de sódio e 10 mM EDTA pH 8) e corado com brometo de etídio. As amostras de RNA total foram tratadas com RQ1 Rnase-free DNase seguindo as especificações do fabricante (Promega). Em seguida o RNA total de cada amostra foi novamente ressuspensionado e quantificado no NanoDrop ND-1000.

3.26. Determinação do início da transcrição do gene *cmf* (XAC0330) por ensaio do ensaio de extensão de oligonucleotídeo (*Primer extension*)

Cerca de 100 pmol dos oligonucleotídeos M13Direto (F) 5'GTAAACGACGGCC AGT 3' e XAC0330Reverso (R) 5'CAGCGACGACAGCGACGGCTT 3' foram marcados com 30 µCi de [γ 32 P]-ATP por 1 hora a 37°C, utilizando 15 U da enzima T4 Polinucleotídeo Quinase (USB) em tampão fornecido pelo fabricante. Em seguida o DNA foi precipitado com etanol absoluto, 1/10 de acetato de sódio 3 M e tRNA de levedura por 1 hora em gelo seco, centrifugado por 30 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 70% em água DEPC. Depois de seco, o precipitado foi ressuspensionado em 20 µl de água tratada com DEPC e 1 µl foi retirado para a determinação da quantidade de cpm em contador de cintilação.

Cerca 10 x 10⁶ cpm de cada oligonucleotídeo foram adicionados a 50 µg de RNA total isolado de células das linhagens selvagem (WT) e mutante (XAC0330). A seguir cada mistura foi precipitada com 45 µl de acetato de sódio 3M pH 5,4 e 200 µl etanol absoluto, num volume final de 345 µl por 1 hora na presença de gelo seco. O precipitado obtido, depois de seco, foi solubilizado em 25 µl de tampão de hibridização (Pipes pH 7,0, 100 mM; EDTA 5 mM e NaCl 1 M), submetido à fervura por 10 minutos e incubado a 55°C durante a noite para promover a hibridização do oligonucleotídeo ao mRNA. Em seguida foram adicionados 40 µl

de água e 180 µl de etanol absoluto, sendo a mistura foi precipitada em gelo seco por 1 hora. Após centrifugação a 12 000 xg por 30 minutos a 4°C e secagem, o precipitado foi solubilizado em 10 µl de tampão para transcriptase reversa fornecido pelo fabricante 1 mM de dNTPs, 40 U de inibidor de ribonucleases (*RNAse Out*, Invitrogen) e 200 U de transcriptase reversa *SuperScript III RNAseH⁻* (Invitrogen) em um volume final de 50 µl. A extensão do oligonucleotídeo pela transcriptase reversa (síntese do cDNA) foi feita por 1 hora a 50°C. As moléculas de RNA foram degradadas pela adição de 30 µg de RNAse A (Sigma) e incubação a 37°C por 30 minutos. Ao tubo da reação foram adicionados 150 µl de TE seguindo-se uma extração com fenol:clorofórmio (1:1) e precipitação com 20 µl de NaOAc 3M pH 5,4 e 600 µl de etanol absoluto por 1 hora em gelo seco. Após centrifugação por 30 minutos a 12000 x g a 4°C, lavagem com etanol 70%, o precipitado seco foi ressuscitado em 6 µl de tampão de amostra (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%). As amostras foram fervidas por 3 minutos em banho-maria e aplicadas em gel de poliacrilamida-uréia 6%. O tamanho dos produtos de extensão foi determinado por comparação com reações de sequência de DNA simples fita do bacteriófago M13. A sequência do M13 foi obtida por reações de sequenciamento manual com o *kit Thermosequenase Cycle Sequencing* (USB), segundo instruções do fabricante utilizando 3 X 10⁶ cpm do oligonucleotídeo M13*forward* e 400 ng de DNA do M13 como molde. Este ensaio foi realizado com o auxílio do Dr. José Freire da Silva Neto, no laboratório da Profa. Dra. Marilis do Valle Marques (Depto. Microbiologia-ICB/USP).

4. Resultados

“Preâmbulo sobre a organização deste capítulo”

Os resultados desta tese descrevem os estudos sobre os fenótipos dos 56 mutantes de XAC produzidos neste projeto de pesquisa. Para facilitar a apresentação destes resultados, dividimos este capítulo em cinco seções, onde:

4.1. Fornece uma visão geral dos fenótipos estudados e relaciona a deleção de um determinado gene de XAC com a alteração de fenótipo(s) estudado.

4.2. Descreve os fenótipos dos mutantes envolvidos com a via do *quorum-sensing* e sinalização por c-diGMP: $\Delta rpfF$ -C-G, Δclp e genes codificadores das proteínas GGDEF que interagem com RpfG_{HD-GYP}.

4.3. Apresenta os resultados do receptor XAC1971_{PilZ} que regula a mobilidade e agregação celular em XAC.

4.4. Descreve os fenótipos do mutante $\Delta csrA$ e a regulação de CsrA sobre a sinalização por c-diGMP e patogenicidade de XAC.

4.5. Caracteriza o efeito pleiotrópico da mutação em *rpoZ* e suas implicações no controle das concentrações de c-diGMP e (p)ppGpp na célula de XAC.

4.1. Análise geral dos fenótipos das cepas mutantes produzidas neste projeto de pesquisa

Durante o doutorado foram produzidos 56 mutantes não-polares por recombinação homóloga utilizando o vetor suicida pNPTS138. O envolvimento de um gene específico na regulação de um determinado fenótipo (tais como, mobilidade biossíntese de goma xantana, agregação celular, produção de fatores de virulência e patogenicidade) foi confirmado por complementação e/ou expressão induzida do gene na cepa mutante. Para facilitar a leitura deste capítulo, a Tabela 9 relaciona os mutantes de XAC com os seus fenótipos observados nos diferentes ensaios que realizamos. Estes resultados serão apresentados mais detalhadamente nas próximas seções

Tabela 8. Fenótipos observados para os mutantes de XAC produzidos neste projeto de pesquisa. Os sinais – e +, indicam diminuição e aumento, respectivamente. NA, fenótipo não alterado em relação a cepa selvagem. ND, fenótipo não determinado.

Genes	Deleção em XAC									Super expressão em XAC		
	Mobilidade Eiken ágar	Mobilidade SB ágar	Goma Xantana	Agregação	Morfologia da colônia	Endoglucanases	Proteases	Virulência	Complementação pUFR047	Mobilidade em SB	Enzimas Extracelulares	Goma xantana
XAC0208 (família NtrC)	NA	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC0258 (GGDEF)	+	NA	ND	NA	NA	-	NA	NA	ND	-	-	-
XAC0330 (<i>cmf</i>)	NA	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	+	ND	ND
XAC0424 (GGDEF)	NA	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-
XAC0483 (<i>clp</i>)	-	-	-	+	Rugosa	-	-	-	Restaurou	NA	+	ND
XAC0494 (histidina quinase)	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC0495 (GGDEF-EAL)	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	+	ND	ND
XAC0593 (GGDEF)	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	+	ND	ND
XAC0644 (GGDEF)	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC0696 (<i>xcxE</i>)	ND	ND	ND	NA	NA	-	-	-	ND	ND	ND	ND
XAC1185 (SpoT-HD)	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	NA	NA	ND
XAC1040 (<i>ppk</i>)	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC1330 (CYTH)	NA	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	-	ND	ND
XAC1420 (GGDEF)	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	-	ND	ND
XAC1486 (GGDEF)	+	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	-	ND	ND
XAC1735 (<i>hfq</i>)	-	-	ND	ND	NA	-	-	NA	Restaurou	ND	ND	ND

Genes	Deleção em XAC									Super expressão em XAC		
	Mobilidade Eiken ágar	Mobilidade SB ágar	Goma Xantana	Agregação	Morfologia da colônia	Endoglucanases	Proteases	Virulência	Complementação pUFR047	Mobilidade em SB	Enzimas Extracelulares	Goma xantana
XAC1743 (<i>csrA</i>)	-	-	-	+	Rugosa	-	NA	-	Restaurou	ND	ND	ND
XAC1879 (<i>rpfF</i>)	-	-	-	+	Rugosa	-	-	-	Restaurou	ND	ND	ND
XAC1878 (<i>rpfC</i>)	-	-	-	+	Rugosa	-	-	-	ND	ND	ND	ND
XAC1877 (<i>rpfG</i>)	-	-	-	+	Rugosa	-	-	-	Restaurou	+	NA	ND
XAC1883 (hipotética)	NA	-	ND	NA	NA	-	-	NA	ND	-	ND	ND
XAC1884 (hipotética)	NA	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	NA	ND	ND
XAC1887 (GGDEF-EAL)	+	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	+	NA	ND
XAC1938 (GGDEF-EAL)	+	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC1939 (GGDEF)	+	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC1940 (GGDEF)	+	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC1971 (PilZ)	+	NA	ND	NA	NA	-	NA	NA	Restaurou	-	NA	NA
XAC1975 (<i>fliC</i>)	+	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC2382 (GGDEF-EAL)	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC2398 (GGDEF-EAL)	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	Restaurou	ND	ND	ND
XAC2482 (GGDEF)	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	-	ND	ND
XAC2492 (histidina quinase)	-	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND

Genes	Deleção em XAC									Super expressão em XAC		
	Mobilidade Eiken ágar	Mobilidade SB ágar	Goma Xantana	Agregação	Morfologia da colônia	Endoglucanases	Proteases	Virulência	Complementação pUFR047	Mobilidade em SB	Enzimas Extracelulares	Goma xantana
XAC2583 (<i>gumD</i>) (Dunger <i>et al.</i> , 2007a)	-	-	-	NA	Não gomosa	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC2868 (EAL)	+	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC2870 (CheB)	+	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC2924 (<i>pilT</i>)	NA	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	Restaurou	ND	ND	ND
XAC2975 (<i>ptsK</i>)	-	-	ND	NA	NA	-	NA	NA	Restaurou	+	ND	ND
XAC3098 (<i>pilL</i>)	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC3113 (<i>relA</i>)	ND	-	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC3229 (<i>pilB</i>)	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC3394 (<i>rpoZ</i>)	-	-	-	+	Rugosa	-	-	-	Restaurou	ND	ND	ND
XAC3402 (PilZ)	-	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	Restaurou	+	NA	NA
XAC3518 (PilZ)	ND	ND	ND	NA	NA	-	-	-	ND	ND	ND	ND
XAC3544 (<i>xpsE</i>)	ND	ND	ND	NA	NA	-	-	-	ND	ND	ND	ND
XAC3683 (histidina quinase)	+	NA	ND	NA	NA	-	-	NA	ND	ND	ND	ND
XAC4103 (<i>rapK</i>)	NA	-	ND	NA	NA (branca)	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
XAC0258 GGDEF/ XAC0424 GGDEF	ND	NA	ND	NA	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XAC0258 GGDE / XAC1940 GGDEF	ND	+	ND	NA	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Genes	Deleção em XAC									Super expressão em XAC		
	Mobilidade Eiken ágar	Mobilidade SB ágar	Goma Xantana	Agregação	Morfologia da colônia	Endoglucanases	Proteases	Virulência	Complementação pUFR047	Mobilidade em SB	Enzimas Extracelulares	Goma xantana
XAC0258 GGDEF/ XAC1420GGDEF	ND	-	ND	NA	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XAC2583 (<i>gumD</i>)/ XAC3229 (<i>pilB</i>)	-	-	-	NA	Não gomosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
XAC2924 (<i>piIT</i>)/ XAC1975 (<i>fliC</i>)	ND	+	ND	NA	NA	ND	ND	ND	<i>piIT</i> Restaurou	ND	ND	ND
<i>rpfF</i> /XAC1971 <i>pilZ</i>	+	+	ND	-	Lisa	ND	ND	ND	<i>XAC1971</i> Restaurou	ND	ND	ND
<i>rpfF</i> /XAC3402 <i>pilZ</i>	-	-	ND	+	Rugosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rpfF</i> /XAC3518 <i>pilZ</i>	ND	+	ND	ND	Lisa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rpoZ</i> / <i>relA</i>	ND	-	ND	+	Rugosa	NA	ND	-	<i>rpoZ</i> Restaurou	ND	ND	ND
<i>pilB</i> –XCC3097 XCC ATCC33913	+	+	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND

4.1.1. Estudos da mobilidade dos nocautes de XAC nos meios semi-sólidos Eiken e SB

Inicialmente testamos a mobilidade dos mutantes no meio Eiken 0.6% ágar, o qual foi usado por (Ryan *et al.*, 2007) para demonstrar a mobilidade dependente do pilus tipo 4 (PT4) em XCC (Figura 35). Neste ensaio verificamos uma redução da mobilidade das cepas nocautes para genes da via Rpf (*rpfF*-C-G e *clp*) de XAC, semelhante ao que ocorre em XCC (Tabela 8). Adicionalmente, verificamos uma redução da mobilidade também nas cepas carregando as deleções dos genes *XAC1040* (*ppk* - polifosfato quinase), *hfq* (XAC1735 – chaperona de RNAm), *csrA* (XAC1743 – regulador pós-transcricional), *XAC2492* (histidina quinase), *XAC2975* (*ptsK* ou *hprK* – bifuncional histidina quinase e fosfatase), *rpoZ* (XAC3394 – subunidade ω da RNA polimerase), *XAC3402*_{PilZ} e *gumD* (participa na via de biossíntese de goma xantana) (Tabela 8). Por outro lado, observamos um aumento da mobilidade nos nocautes de genes que codificam algumas proteínas com os domínios GGDEF e EAL (XAC0495, XAC1486, XAC1887, XAC2868, XAC2382 e XAC2398), histidina quinase XAC3683, o receptor XAC1971_{PilZ} e homólogos de genes que codificam proteínas envolvidas na formação do PT4 (XAC3098 (*pilL*) e XAC3229 (*pilB*)) e flagelo XAC1975 (*fliC*) (Figura 35). Os experimentos de mobilidade em meio Eiken 0.6% ágar foram realizados em triplicata, sendo que os diâmetros dos halos das colônias foram medidos após três dias de crescimento a 30 °C. O valor da média dos diâmetros da mobilidade de cada mutante está descrito no gráfico da Figura 36.

No meio SB 0,5% ágar observamos fenótipos de mobilidade similares aos que os nocautes de XAC desenvolveram no meio Eiken (Tabela 8) (Figura 37). No entanto, alguns mutantes mostram apenas alterações da sua mobilidade no meio SB. Por exemplo, foi observado uma redução na mobilidade dos nocautes de XAC0208 (*ntrC* – ativador do sigma54) e XAC4103. No trabalho Andrade *et al.* (2006) identificamos a interação entre XAC0208 e a proteína RpfG. Esta interação pode ser importante para entender a redução da mobilidade na cepa Δ XAC0208. O homólogo de XAC4103 em XCC está envolvido com a síntese da molécula sinalizadora DF, ácido 3-hidroxibenzóico, que ativa a produção do pigmento xantomonadina e goma xantana (He *et al.*, 2011; Poplawsky and Chun, 1997). De modo interessante a cepa de XAC carregando a deleção de XAC4103 forma colônias esbranquiçadas indicando a ausência de xantomonadina, contudo a redução da mobilidade pode estar relacionada a uma diminuição da produção de goma xantana nesta cepa.

Diferente dos seus comportamentos no meio Eiken, o mutante Δ *pilT* (XAC2924) mostrou um aumento significativo da sua mobilidade no meio SB 0,5% ágar e as cepas com as deleções das orfs hipotéticas XAC1883 e XAC1884 e de um grupo de genes que codificam proteínas GGDEF e EAL (XAC0424, XAC1486, XAC2868 e XAC1887) tiveram sua mobilidade reduzida no meio SB.

Figura 37. Efeito das deleções de genes de XAC na mobilidade em meio SB 0,5% ágar. As diferentes cepas foram inoculadas na placa e incubadas por 3 dias a 30 °C. No lado direito há um diagrama representando as inoculações em cada placa: Wt, cepa XAC selvagem; M, cepa mutante. Os nomes dos genes deletados estão indicados abaixo de cada placa. Em vermelho destacam-se as deleções que ocasionaram redução na mobilidade e em azul os nocautes que tiveram sua mobilidade aumentada em relação à cepa de XAC selvagem.

Diferenças entre os tamanhos das colônias da cepa selvagem e mutantes de XAC não são observadas no meio SB 1,5% ágar (Figura 38). Isto indica que a mobilidade desenvolvida por estas cepas no meio semi-sólido SB 0,5% ágar é resultado de um processo de dispersão celular. Contudo as células de XAC perdem essa capacidade de se moverem na superfície do meio SB quando se aumenta a maior concentração de ágar.

Figura 38. As cepas de XAC selvagem e mutantes não são capazes de se dispersarem no meio SB 1.5% ágar. Em branco, cepas que não tiveram as suas mobilidades alteradas em relação à cepa selvagem no meio SB 0,5% ágar; Vermelho, cepas que tiveram as suas mobilidades reduzidas; Azul, cepas que tiveram as suas mobilidades aumentadas. Colônias foram crescidas por 2 e 3 dias a 30 °C.

4.1.2. Complementação dos nocautes *hfq* e *ptsK*

Para confirmar se os genes deletados do cromossoma de XAC estão de fato relacionados com os fenótipos de mobilidade observados, clonamos a orf com o seu respectivo promotor no vetor pUFR047 e transformamos as células competentes mutantes de XAC com esta construção.

Aqui destacamos os mutantes Δhfq e $\Delta XAC2975$ (*ptsK*) que apresentaram vários fenótipos alterados, como por exemplo a mobilidade (Tabela 8). Hfq é uma proteína com função de regular a estabilidade de RNA mensageiros codificadores de fatores de virulência em bactérias, sendo homóloga a proteínas Sm envolvidas no processo de *splicing* em eucariotos (Ansong *et al.*, 2009). Por outro lado, o gene *ptsK* codifica uma proteína que pode atuar tanto como histidina quinase ou fosfatase em condições específicas, controlando o estado de fosforilação da proteína fosfotransportadora HPr, que regula o transporte de recursos de carbono para dentro da célula bacteriana (Russell *et al.*, 2002; Mijakovic *et al.*, 2002). Adicionalmente, a interação entre PtsK e o domínio HD-GYP de RpfG de XAC foi

observada por sistema de dois híbridos (Andrade *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem uma função na regulação da mobilidade de XAC por Hfq e PtsK.

A Figura 39 mostra a complementação dos mutantes *hfq* e XAC2975 com as construções pUFR047-*hfq* e pUFR047-XAC2975, respectivamente. A complementação destes mutantes restaurou por completo a mobilidade de Δ XAC2975, mas de modo parcial, a mobilidade de Δ *hfq* no meio SB (Figura 39).

A complementação do nocaute de XAC2398 (*fimX*) com a construção a pUFR047-*fimX* também recuperou a sua mobilidade no meio SB 0,5% ágar, e seus resultados são discutidos no trabalho publicado (Guzzo *et al.*, 2009).

As complementações dos mutantes envolvidos com o processo de *quorum-sensing* e sinalização pelos segundos mensageiros c-diGMP e (p)ppGpp - Δ *rpfG*, Δ *clp*, Δ XAC1971_{*PilZ*}, Δ *csrA* e Δ *rpoZ* - estão descritas nas seções 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 a seguir.

Figura 39. Complementação dos nocautes Δ XAC2975 (*ptsK*) e Δ *hfq* que tiveram a mobilidade alterada. O nome dos mutantes são indicados abaixo de cada placa. 1, cepa selvagem com o plasmídeo pUFR047 vazio; 2, mutante; 3, mutante complementado. As cepas foram inoculadas em meio SB 0,5% ágar e crescidas por 3 dias a 30 °C.

4.1.3. A super expressão de *rpfG* suprime a perda de mobilidade nas cepas $\Delta XAC2975_{ptsK}$ e Δhfq

Observamos que a super-expressão de *rpfG* na construção pBRA-*rpfG*, que se encontra fusionada no promotor BAD, suprimiu a perda da mobilidade dos mutantes $\Delta XAC2975_{ptsK}$ e Δhfq (Figura 40). Estes resultados indicam uma possível sobreposição de $XAC2975_{ptsK}$ e *hfq* e a via Rpf em XAC. $XAC2975_{ptsK}$ e Hfq podem regular a expressão ou fazer um controle pós-transcricional em *rpfG* de forma controlar a sua atividade de fosfodiesterase. Não podemos confirmar nossa hipótese porque experimentos para verificar a expressão de *rpfG* e ensaios de quantificação de c-diGMP nestes mutantes ainda não foram realizados.

Figura 40. Supressão da perda de mobilidade nos nocautes de $\Delta XAC2975$ e Δhfq com a super expressão de *rpfG*. A construção pBRA-*rpfG* onde *rpfG* fusionado ao promotor BAD, foi usada para transformar as cepas mutantes. No diagrama representativo, wt é a cepa selvagem transformada com o plasmídeo pBRA vazio; M é o nocaute; e C é o nocaute transformado com pBRA-*rpfG*. Na coluna da esquerda as cepas foram inoculadas em meio SB 0,5% ágar, e na coluna da direita inoculadas no meio SB 0,5% ágar suplementado com 0.3% L-arabinose (SBA). As cepas foram crescidas por 3 dias a 30 °C.

4.1.4. Análise da produção de endoglucanases nos nocautes

As endoglucanases são um dos fatores importantes na virulência de *Xanthomonas*, por atuar degradando a parede das células do hospedeiro, permitindo a colonização dos tecidos pela bactéria (Abramavitch *et al.*, 2006). A produção de endoglucanases em XCC aumenta em resposta ao processo de *quorum-sensing*, sendo este processo regulado pelo sistema de dois componentes RpfC-RpfG (Slater *et al.*, 2000).

De modo geral, a produção de endoglucanases presentes nos sobrenadantes das cepas selvagem e nocautes de XAC foi investigada de acordo com o ensaio que mede o halo de degradação de celulose no substrato carboximetilcelulose (CMC) (Tang *et al.*, 2001). As atividades de endoglucanases obtidas para as diferentes cepas mutantes de XAC são apresentadas nas Figuras 41 e 42.

Assim como demonstrado para XCC e XOO (Buttner and Bonas, 2009; Slater *et al.*, 2000b; Sun *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011), as deleções de *rpfF*, *rpfC*, *rpfG*, *clp* e *csrA* apresentaram uma redução da produção de endoglucanases em XAC. Adicionalmente, identificamos novos reguladores da produção de endoglucanases em XAC, são eles: *XAC1971_{PilZ}*, *hfq*, *XAC3683*, *XAC2975_{ptsK}*, *XAC0258_{GGDFE}* *rpoZ* (*XAC3394*) e *XAC1883* (Figura 42).

Além dos nocautes de genes envolvidos com o *quorum-sensing* e sinalização por c-diGMP e (p)ppGpp, as deleções de *XAC3683* (codifica uma histidina quinase) e de *XAC1883* (codifica um domínio de ligação a DNA, o AbrB (Robertson *et al.*, 1989)) reduziram em 60% a produção de endoglucanases em XAC (Figura 42). De modo interessante a interação entre as proteínas *XAC3683* e *XAC1883* foi observada em nosso laboratório. Estes dados indicam que *XAC3683* pode atuar como ativador de *XAC1883*, que por sua vez teria um papel de controlar positivamente a expressão de endoglucanases em XAC. Adicionalmente, os

nocautes de *hfq* e *2975_{ptsK}* também apresentaram uma redução significativa da produção de endoglucanases (Figura 42).

Figura 41. Atividade de endoglucanases nos mutantes de XAC. Os halos foram produzidos pela degradação da carboximetilcelulose (CMC) pelas endoglucanases presentes nos sobrenadantes das culturas crescidas no meio 2xTY a 30 °C até DO_{600nm} 2. As placas com CMC foram incubadas a 37 °C por 20 horas, coradas com vermelho congo 0.1 % e descoloridas com solução 1 M de NaCl. Todos os mutantes indicados abaixo na figura apresentaram redução na produção de endoglucanases, com exceção do nocaute de XAC4103, que não mostrou alteração. No diagrama representativo, Wt representa onde foi colocado o sobrenadante da cepa selvagem, e M onde foi colocado o sobrenadante de cada mutante. Os nomes dos genes deletados encontram-se abaixo de cada placa.

Figura 42. Efeito da deleção de diferentes genes na produção de endoglucanases em XAC. A atividade de endoglucanase dos sobrenadantes das culturas da cepa selvagem foi comparada com a atividade das culturas dos mutantes. As cepas foram crescidas no meio 2xTY a 30 °C até $DO_{600\text{ nm}} = 2$. A atividade de endoglucanases foi determinada em função dos halos produzidos pela degradação da carboximetilcelulose (CMC) em placas com CMC incubadas a 37 °C por 20 horas.

4.1.5. Análise da produção de proteases extracelulares nos nocautes de XAC

A produção de proteases extracelulares nos mutantes de XAC foi investigada, assim como em XCC (Slater *et al.*, 2000a), constatamos a atuação positiva dos genes *rpfF-C-G* sobre a produção destes fatores de virulência. Adicionalmente, novos reguladores da produção de proteases extracelulares foram identificados: *hfq*, XAC3683 e *rpoZ* (XAC3394). De modo interessante não foi observado redução da produção de proteases extracelulares no mutante $\Delta csrA$ nestes ensaios (Figura 43).

Os resultados das complementações dos mutantes $\Delta rpfG$, Δclp e $\Delta rpoZ$ são descritos a seguir nas seções 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente.

Figura 43. Produção de proteases extracelulares nos mutantes de XAC. Os nocautes *rpfF*, *rpfC*, *rpfG*, XAC3683, *hfq* e XAC3394 (*rpoZ*) mostraram uma redução na atividade de proteases extracelulares comparado com a cepa selvagem. Os nocautes de *csrA* e XAC4103 não tiveram alteração significativa na atividade de proteases extracelulares. O halo indica a degradação de caseína presente no meio LB suplementado com 1% de leite desnatado. No diagrama, Wt, representa a cepa selvagem; M, mutante.

4.1.6. Teste de patogenicidade dos mutantes na planta hospedeira

Os nocautes de XAC obtidos por recombinação homóloga foram inoculados em plantas hospedeiras (laranja pêra- *Citrus sinensis*) para testar a capacidade de desenvolver cancro cítrico. Na Figura 44 são mostradas fotos das folhas inoculadas tiradas entre 7 e 10 dias após a inoculação. Na Figura 44 destacam-se os mutantes $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$, cujas cepas tiveram a sua patogenicidade significativamente reduzidas nestes ensaios. A alteração da patogenicidade destes dois mutantes pode ser melhor verificada na Figura 45.

Figura 44. Inoculação das cepas selvagem e nocautes de genes de XAC em folhas de laranja pêra. As fotos foram tiradas entre sete e dez dias após a inoculação. S, representa a cepa selvagem; M, cepas mutantes. O gene deletado está indicado abaixo de cada foto.

Figura 45. Alteração da patogenicidade dos mutantes *csrA* e *rpoZ* mostrando redução dos sintomas característicos do cancro cítrico: Encharcamento (*water-soaking*), hiperplasia tecidual e clorose. Wt, cepa de XAC selvagem; *csrA*, mutante de XAC com deleção do gene *csrA*; *rpoZ*, mutante *rpoZ*.

4.1.7. Determinação do início da transcrição de XAC0330 (*cmf*) por ensaio de extensão de oligonucleotídeo (*Primer extension*)

Nosso grupo identificou a interação entre a proteína quinase RpfC e a proteína CMF (XAC0330), cuja função ainda não foi determinada em *Xanthomonas* (Andrade *et al.*, 2006). Homólogos de *cmf* estão presentes em protozoários amebóides como *Dictyostelium*

discoideum, onde apresentam um papel importante na comunicação celular, ativando a via do *quorum-sensing* e o comportamento multicelular nestes organismos (Deery *et al.*, 2002). A cepa mutante Δ XAC0330 mostrou um pequeno aumento na mobilidade não sendo observada outra alteração nos fenótipos analisados (Tabela 8).

No trabalho Andrade *et al.* (2006) realizamos um alinhamento das sequências dos genes homólogos de *cmf* em várias espécies de *Xanthomonas*. Desta análise levantamos a hipótese que em alguns desses genomas, incluindo o de XAC, o primeiro códon poderia ter sido anotado errado. Especificamente propusemos que o primeiro códon de XAC0330 deveria estar 300 nucleotídeos *upstream* do códon inicialmente proposto (Andrade *et al.*, 2006). Através do ensaio de extensão de oligonucleotídeo utilizando o RNA total extraído das cepas selvagem e Δ XAC0330 (Δ *cmf*) determinamos o início da transcrição do gene *cmf* (XAC0330) (Figura 46). Esse resultado confirma o início de transcrição previsto para *cmf* no trabalho publicado Andrade *et al.* (2006). O experimento foi realizado no laboratório da Profa Dra Marilis do Valle Marques (Depto. Microbiologia, ICB-USP) com auxílio do Dr. José Freire Neto.

A)

B)

```

GATTAGGCGTCAAGACGAACGTGTCTGTGTGCCAGTCAACGTAGGCTTGAGGCGGTCACACCGCTACTGATCGGGCGATGGGTCCGTGGCGATGCTGGCCG
GGACGAGAGCGGCTGAATGCGCTGCGTCCCATGGTGGACAAGGCAATCTGGCCGCTACAGCGGCAGTGCACGAGATTGAAGGGGAATTCCGGTCTTCATCGC
TGCATTCTTCTCTGCGACAACGCCGCGTCCGCGACCCTGATCGCACTCGGTGTCGTTTAAATTTCTAGCGACATGCACGCAGCGCCGTGAGTGTTCAGTGC
ACAGCAGACCTGTCAAGAGCGCGGTATAACCATCCACGAATCGCGGCGAGGGGGCGCTGCATCCGGTGTGCTTGCCGTGCGCGATGGCATCGCTTCTGC
AATGCTCACGGAGAGATCTTGCCCATG

```

Figura 46. A) Sequenciamento da região 5' do RNA mensageiro de *cmf* (XAC0330) pelo método de extensão de oligonucleotídeo. T, A, C e G indicam as reações utilizando o oligonucleotídeo M13*forward* e o DNA do bacteriófago M13 contendo além de dNTPs também os respectivos dideoxinucleotídeos. Mut, reação de sequenciamento com o RNA total do mutante Δ XAC0330. WT, reação de sequenciamento com o RNA total da cepa de XAC selvagem. **B)** Sequência da região 5' do gene *cmf* (XAC0330) mostrando as regiões -10 e -35 do promotor em vermelho, o sítio +1 da transcrição (determinado neste ensaio) em azul e a sequência RBS (sítio de ligação ao ribossomo) sublinhado.

4.1. Comunicação celular e sinalização por diGMP cíclico: Sistema *rpf*, diguanilato ciclases (GGDEF) e fosfodiesterases (HD-GYP e EAL)

4.2.1. Análise de interações do domínio HD-GYP de RpfG com domínios GGDEF de *Xanthomonas* em levedura

A proteína RpfG é ativada durante o processo de comunicação célula-célula em resposta ao aumento da densidade de células no meio (Ryan *et al.*, 2010a). RpfG possui dois domínios denominados Regulador de resposta e HD-GYP (Figura 47A). Descrevemos no trabalho Andrade *et al.* (2006) interações envolvendo o domínio HD-GYP de RpfG com proteínas GGDEF de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (XAC). O domínio HD-GYP pertence à super família de hidrolases metal-dependentes HD com um motivo a mais -GYP- também conservado (Figura 47A). Ryan *et al.* (2006) confirmou sua atividade de fosfodiesterase específica para diGMP cíclico.

Em colaboração com o grupo do Dr. Max Dow, University College Cork, ensaios de dois-híbridos foram realizados para verificar a capacidade do domínio HD-GYP de RpfG de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (XCC) também interagir com proteínas GGDEF. Nestes ensaios confirmamos a interação do domínio HD-GYP de XCC com diguanilato ciclases específicas de XAC (Figura 47B). Após confirmarmos esses resultados, utilizamos variantes do domínio HD-GYP da RpfG de XCC para determinar a importância desses resíduos na interação com o domínio GGDEF. As variantes AD-GYP e HA-GYP apresentaram o mesmo grau de interação que o domínio HD-GYP com as proteínas GGDEF (Figura 47B). No entanto as variantes HD-AYP, HD-GAP, HD-GPA e HD-AAA diminuíram sua interação com os domínios GGDEF, indicando a importância dos resíduos GYP em regular a interação com proteínas diguanilato ciclases em *Xanthomonas* (Figura 47C).

A)

B)

C)

Figura 47. A interação da proteína RpfG de XCC com o domínio GGDEF de diguanilato ciclases específicas de XAC requer o motivo GYP mas não o HD. **A)** Esquema representativo dos domínios presentes na proteína RpfG de *Xanthomonas*. **B e C)** Ensaio de β -galactosidase para medir as interações entre o domínio GGDEF de diferentes diguanilato ciclases com o domínio HD-GYP mutado para os resíduos que formam o motivo **B)** HD e **C)** GYP. Os números sobre as barras representam as porcentagens de colônias crescidas em meio seletivo comparado com as crescidas em meio rico, para cada interação entre HD-GYP e proteínas GGDEF. O eixo Y indica a produção de β -galactosidase em unidades de Miller para cada interação analisada. 1) Cepa PJ69-4a vazia, 2) controle PJ69-4a transformada somente com pOBD-HD-GYP e co-transformação de PJ69-4a com pOBD-HD-GYP e as proteínas GGDEF 3) pOAD-XAC0258, 4) pOAD-XAC0424, 5) pOAD-XAC0593, 6) pOAD-1420, 7) pOAD-XAC1488, 8) pOAD-1940, 9) pOAD-2382 e 10) pOAD-XAC1887 (controle negativo).

4.2.2. Ensaio de dois híbridos com a diguanilato ciclase XAC0424

Uma das diguanilato ciclases, descrita no trabalho Andrade *et al* (2006), que interagiu com o domínio HD-GYP foi XAC0424. A orf XAC0424 está próxima do *cluster* de genes que codificam para o sistema de secreção tipo III em XAC, o que a torna interessante para ser estudada.

Na tentativa de encontrar seus parceiros de interação, foi obtida a construção pOBD-XAC0424, a qual foi usada como isca contra uma biblioteca de XAC produzida em nosso laboratório por Alegria *et al* (2005). Após as várias etapas de seleções, o DNA plasmidial foi extraído das colônias positivas e sequenciado para determinar a identidade das presas. Na Tabela 9 estão listadas todas as proteínas que interagiram com XAC0424, com exceção dos falsos positivos descritos por Alegria *et al* (2005). Interessante ressaltar que XAC0424 interagiu com ela mesma 8 vezes a partir dos primeiros resíduos do seu amino-terminal, indicando a que talvez a dimerização/oligomerização da proteína pode ser importante. A proteína XAC0424 possui 542 aminoácidos, sendo que seu amino-terminal apresenta repetições de leucinas que podem ser cruciais para promover a interação homotrópica, e consequentemente ativar sua atividade de síntese de diGMP cíclico (Figura 48).

```

MADQPEHPSRPRGGLRRLLPWGGTDTARPAALPTVINGERGGHGLAAHQLVPAKAKSGA
HDPAAATALLIRLFSHAHPAALLLAFAEGIASLHGELGDMGVRLSAAYAAGDWPYGRA
LRQLIDKYIRTIDIGDSLAEGRTEAEQLRDLLRHALGNALATLLQRSPELAEEAQTLSA
LRHWRPGHELITLQRLRELSHQIGLRAEDASEQQNLLLGLFDLLENVGEELLDDRSWLQ
GQITVVRQLISGPLDVSSIEQARGTLREVTYKQGLLKQGIASKTAMREMMVSFVDRLDG
MATSTGEYHDRVAGYSQAIGEARGI PDLNRLQDQLQDTAGVQAQALAAARDELLAARRQV
EDSEQRIASLEQELKDVAGLVREDQLTGALNRRGFEEFQREAVRTQSRSGQPLCVAMLDL
DDFRRNLNETHGHAGGDAALRHTVEVAKAVLRTTDAIARFGGEFVLLLPDSTIFEASAAV
IRLQRALSQRSLLHDDVRVFISFSAGVALRGTDDETQDEVIRRADRAMYDAKAAGKNRVIN
AD

```

Figura 48. Análise da estrutura primária da proteína XAC0424. O domínio GGDEF encontra-se sublinhado. Os resíduos em vermelho podem formar um *coiled-coil* e os resíduos de leucina em azul indicam um suposto motivo com repetição de leucina a cada sete resíduos. Os resíduos em verde fazem parte do sítio-I e sítio-A do domínio GGDEF. Para as análises utilizamos os programas Pfam (pfam.sanger.ac.uk) e 2ZIP (<http://2zip.molgen.mpg.de/cgi-bin/2zip.pl>).

Tabela 9. Proteínas que interagiram com XAC0424 no ensaio de dois híbridos.

Isca = XAC0424	Regiões codificadoras (Presas)	
	Nome	Resíduo inicial (Número de interações)
	XACb0010 (<i>cointegrate resolution protein T</i>)	45(1), 186(1), 122(1)
	XAC1039 (<i>exopolyphosphatase or ppx</i>)	6(1)
	XAC0424	83(1), 36(2), 1(5)
	XAC4250 (<i>Glycosyl hydrolase family 2</i>)	1(2)

4.2.3. Ensaio para verificar a produção c-diGMP por 6HisXAC0424

A orf XAC0424 com 1626 pb foi amplificada do genoma de XAC usando oligos específicos e clonada no vetor de expressão pROEX-b (Invitrogen) (Figura 49A). A proteína recombinante 6HisXAC0424 com aproximadamente 62.1 KDa foi expressa em *E. coli* BL21(DE3) e purificada em coluna Ni⁺² (Figura 49B). Em seguida testamos sua atividade de diguanilato ciclase *in vitro* (Figura 50) conforme descrito em Materiais e Métodos seção 3.19. Os produtos de reação de 30 minutos e 16 horas foram resolvidos em HPLC coluna C18 (Phenomenex), e as frações com tempo de retenção igual ao padrão c-diGMP foram coletadas. Aproximadamente 50 µL do produto coletado no HPLC para o tempo de retenção de 16

minutos, foram injetados no espectrômetro de massas (ESI-MS/MS), confirmando a identidade da molécula c-diGMP (Figura 50). Dessa forma, confirmamos a capacidade de 6HisXAC0424 produzir c-diGMP.

Figura 49. A) Gel de agarose 1% confirmando a clonagem do gene XAC0424 no vetor de expressão proEX-b (Invitrogen). Duas construções independentes de 6HisXAC0424-proEXb foram digeridas com as enzimas NcoI/XhoI e resolvidas em gel de agarose 1%. B) Gel SDS-PAGE 15% acrilamida com as amostras coletadas durante a purificação de 6HisXAC0424 em coluna de afinidade Sepharose-níquel utilizando um gradiente de imidazol. M, Marcador ; FT, Fração coletada durante a lavagem; F1-F6, frações eluídas da coluna de níquel com gradiente de imidazol.

Figura 50. A e B) Padrões GTP e c-diGMP resolvidos em HPLC coluna C18 e por espectrometria de massas (ESI-MS/MS). **C) e D)** Os produtos das reações catalisadas por 6HisXAC0424 nos tempos de 30 minutos e 16 horas foram analisados em HPLC e por espectrometria de massas. **C)** Abundância relativa dos produtos das reações através do sistema MRM (Monitoramento de múltiplas reações). **D)** Confirmação das massas dos produtos das reações. No tempo de retenção de 16 minutos foi confirmado a presença da molécula de c-diGMP como produto de reação da diguanilato ciclase 6HisXAC0424.

4.2.4. Os mutantes *rpf* promovem o aparecimento dos fenótipos de rugosidade na colônia e agregação celular em XAC

Trabalhos publicados pelo grupo do Dr. Max Dow descrevem o fenótipo agregativo apresentado por mutantes *rpf* de XCC crescidos no meio L (Dow *et al.*, 2003). No modelo de estudo do *quorum-sensing* em XCC, RpfF está envolvida na síntese da molécula sinal DSF, enquanto RpfC liga-se a DSF e fosforila RpfG, ativando a mobilidade e reduzindo a agregação de XCC (Dow *et al.*, 2003). RpfC também interage com RpfF, inibindo sua atividade (Andrade *et al.*, 2006; He *et al.*, 2006b). Obtivemos por recombinação homóloga as deleções dos genes *rpfC*, *rpfG* e *rpfF* de XAC. As Figuras 51 e 52 mostram os fenótipos da cepa selvagem e nocautes dos genes *rpfF-C-G* crescidas no meio L e meio L 1% ágar. Os nocautes *rpf* apresentam colônias rugosas e formam agregados celulares no meio L (Fig. 51 e 52). Colônias de XAC (WT) crescidas em meio L 1% ágar produzem DSF que se difunde e reverte o fenótipo rugoso das colônias do nocaute *rpfF*, tornando-as lisas e brilhantes devido a um possível aumento da produção de goma xantana (Fig. 51). Do mesmo modo, XAC tipo selvagem cresce de maneira dispersa no meio líquido, e os mutantes $\Delta rpfC$, $\Delta rpfG$ e $\Delta rpfF$ formam agregados facilmente visíveis a olho nu (Fig. 52).

Figura 51. Colônias de XAC cepa selvagem (WT) e nocaute para *rpfF* crescidas em meio L 1% de ágar. Na figura pode-se observar a colônia lisa do WT e rugosa do mutante $\Delta rpfF$ (*rpfF*⁻). O sinal DSF proveniente da colônia WT reverte o fenótipo rugoso de $\Delta rpfF$ (*rpfF*⁻).

Figura 52. As cepas de XAC selvagem (WT) e nocautes de $\Delta rpfF$, $\Delta rpfC$ e $\Delta rpfG$ foram crescidas em meio L. Observou-se a presença de agregados celulares nas culturas dos mutantes *rpfF*-C-G, mas não na cultura da cepa selvagem.

4.2.5. Super expressão do gene XAC0424 (Diguanylate ciclase) promove o aparecimento de rugosidade na colônia e agregação celular em XAC

Na seção 4.2.3 mostramos que a proteína recombinante 6HisXAC0424 é capaz de produzir c-diGMP nas condições *in vitro*. Para verificar o efeito da super expressão de uma diguanylate ciclase e do aumento da concentração de c-diGMP na célula de XAC, clonamos o gene XAC0424 fusionado ao promotor induzível por L-arabinose no vetor pBRA, obtendo a construção pBRA-XAC0424. Células de XAC foram transformadas com pBRA-XAC0424 e selecionadas com antibióticos específicos. Observamos um aumento da rugosidade na colônia e o aparecimento do fenótipo agregativo em XAC contendo a construção pBRA-XAC0424 e crescida na presença de L-arabinose (Figuras 53 e 54). Interessantemente estes fenótipos são também observados nos mutantes $\Delta rpfF$ -C-G de XAC (seção 4.2.4). Nossos dados sugerem que o aumento da concentração de c-diGMP em XAC, resultado da super expressão de uma diguanylate ciclase (XAC0424) ou deleção da fosfodiesterase *rpfG*, pode ativar a rugosidade e a agregação celular. Estes fenótipos podem ser resultado do aumento da produção de fímbrias adesivas, redução de enzimas extracelulares que auxiliam na dispersão celular e comprometimento da atividade dos aparatos de mobilidade (flagelo e PT4) (Gottig *et al.*, 2009; Dow *et al.*, 2003; Ryan and Dow, 2011).

Figura 53. A super expressão do gene XAC0424 na cepa WT (selvagem) em placas com meio 2xTY contendo 0.2% de L-arabinose ocasionou o aparecimento de colônias rugosas. WT+ pBRA, cepa de XAC selvagem transformada com o vetor pBRA; WT+ pBRA-XAC0424, cepa selvagem carregando o gene XAC0424 fusionado ao promotor BAD do vetor pBRA. O promotor BAD é induzível por L-arabinose.

Figura 54. A super expressão do gene XAC0424 em XAC promove o aparecimento do fenótipo agregativo na cepa selvagem. Culturas de XAC transformadas com o vetor pBRA (WT+pBRA) e com XAC0424 clonada no vetor pBRA (WT+pBRA-XAC0424) foram crescidas no meio 2xTY contendo 0.2% de L-arabinose.

4.2.6. Análise da mobilidade em meio semi sólido dos mutantes para via *rpf* e diguanilato ciclases que interagiram com RpfG de XAC

Ryan *et al* (2006, 2007) mostrou que os genes *rpfF-C-G* de XCC estão envolvidos na regulação positiva da mobilidade de maneira depende de pilus tipo IV (T4P) em meio Eiken ágar. Adicionalmente Lee *et al* (2003) e He *et al* (2007) observaram que a mobilidade de XCC dependente de flagelo também é ativada pelos genes *rpf*, e mais diretamente pelo fator de transcrição Clp (*CAP Like Protein*). Clp liga-se no promotor de *fliC*, o qual codifica a subunidade flagelina, que compõe o flagelo. Para verificarmos se a mobilidade em meio semi-sólido de XAC é ativada pela via *rpf*, e ainda se depende do flagelo, PT4 ou goma xantana, observamos a mobilidade em meio SB 0,5% ágar dos mutantes $\Delta rpfF-C-G$, Δclp , com deleção para genes codificadores de GGDEF que interagiram com RpfG, $\Delta pilT$, $\Delta pilB$, $\Delta pilL$, $\Delta fliC$ e $\Delta gumD$ (Figura 55).

A mobilidade dos nocautes Δrpf e Δclp em meio SB mostrou-se bastante reduzida (Figura 55A). Em contrapartida observamos um aumento da mobilidade na deleção XAC2382, e dos homólogos envolvidos na formação do PT4 - XAC3098 (*pilL*), XAC2924 (*pilT*) e XAC3239 (*pilB*) (Figuras 55B e 55C). O nocaute para a flagelina $\Delta fliC$ (XAC1975) não mostrou alteração da mobilidade nessas condições (Fig. 55C). No entanto, o nocaute *gumD* apresentou um comprometimento acentuado da mobilidade indicando que a goma xantana seria importante para a mobilidade desenvolvida por XAC neste meio (Fig. 55C). Em relação à deleção dos genes codificadores das diguanilato ciclases que interagem com RpfG, $\Delta XAC0424$, $\Delta XAC1486$, $\Delta XAC1939$, $\Delta XAC1940$ apresentaram uma pequena redução da mobilidade enquanto $\Delta XAC1420$ mostrou um pequeno aumento na mobilidade (Fig. 55B). A cepa carregando as deleções dos genes $\Delta pilT \Delta fliC$ mostrou a mobilidade aumentada, igual ao mutante $\Delta pilT$, indicando que o aumento da mobilidade observada neste mutante é independente do flagelo e negativamente regulada pelo PT4 (Fig. 55C).

Curvas de crescimento no meio SB do mutante $\Delta rpfG$ e Δclp não mostraram diferenças de crescimento em relação a cepa selvagem de XAC (Figura 56). Estas observações indicam diferenças entre as cepas nas placas com o meio SB 0,5% ágar não são devido a diferenças na taxa de crescimento das células.

Figura 55. Ensaio de mobilidade em meio SB 0,5% ágar. **A)** Redução da mobilidade dos mutantes $\Delta rpfF$, $\Delta rpfC$, $\Delta rpfG$ e Δclp . **B)** Mutantes dos genes codificadores para diguanilato ciclasas que interagem com RpfG. **C)** As deleções de *pilB*, *pilT*, *pilL* mostram um aumento da mobilidade enquanto o nocaute de *gumD* reduz sua mobilidade em meio SB 0,5% ágar comparado com cepa WT (selvagem). O nocaute $\Delta fliC$ não mostrou alteração na mobilidade enquanto a cepa carregando as deleções $\Delta pilB \Delta fliC$ mostra uma mobilidade aumentada. Wt, selvagem; M, cepa mutante. Em vermelho os mutantes que tiveram a mobilidade reduzida de modo acentuado, e em azul mutantes com a mobilidade aumentada significativamente.

Figura 56. Curva de crescimento celular no meio SB comparando o crescimento das cepas de XAC selvagem (Wt) e mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp . As culturas foram crescidas sob agitação 200 rpm a 28 °C. As medidas das absorbâncias foram realizadas em triplicatas com três diferentes inóculos para cada cepa.

Adicionalmente, as cepas mutantes que mostraram alteração acentuada na mobilidade foram inoculadas no meio SB 1,5% ágar, e diferentemente do observado no meio semi-sólido SB 0,5%, as cepas não apresentaram mudanças no comportamento de dispersão celular (Figura 57). Todas as colônias mostraram ser do mesmo tamanho nesta condição, indicando que as diferenças observadas entre as cepas no meio semi-sólido SB 0,5% ágar não é relacionado às taxas de crescimento de cada mutante mas sim na sua capacidade de se dispersar.

Figura 57. Cepas de XAC selvagem (Wt) e mutantes $\Delta rpfG$, Δclp , $\Delta piIT$ e $\Delta XAC2382$ não apresentam diferenças no tamanho das colônias no meio SB 1.5% ágar.

Para confirmar se realmente os genes deletados de XAC estão relacionados com os fenótipos de mobilidade observados, foram feitas construções no vetor pUFR047, clonando o gene com seu promotor. As construções obtidas foram usadas para transformar as células mutantes de XAC, que em seguida tiveram suas mobilidades testadas (Figura 58). O mutante $\Delta rpfG$ também foi complementado com construções contendo o domínio HD-GYP e a fosfodiesterase XAC1887 fusionados ao promotor BAD no vetor pBRA (Fig. 58).

No caso do mutante XAC2382 observamos que seu fenótipo é revertido ao tipo selvagem somente com a expressão do seu domínio EAL fusionado ao promotor BAD (Fig. 58). Esse resultado indica que o domínio EAL de XAC2382 pode desempenhar sua função independente do resto da proteína que inclui um domínio GGDEF. Adicionalmente, o domínio EAL de XAC2382 diferente do modelo descrito para fosfodiesterases reduz a mobilidade de XAC, indicando que seu papel de regulação pode ser por interação com outra proteína e não por reduzir a concentração de c-diGMP na célula, como no caso das fosfodiesterases RpfG e XAC1887.

Figura 58. Complementação dos nocautes que tiveram a mobilidade alterada. O mutante $\Delta rpfG$ foi complementado com o gene *rpfG* clonado no vetor pUFR047, e somente o domínio HD-GYP e a orf XAC1887 fusionados ao promotor BAD no vetor pBRA. O mutantes Δclp e $\Delta pilT$ foram complementados com as construções pUFR047-*clp* e pUFR047-*pilT*, respectivamente. O nocaute $\Delta XAC2382$ foi complementado somente com seu domínio EAL fusionado no promotor BAD do vetor pBRA. O nome dos nocautes encontra-se abaixo de cada placa. Wt, cepa selvagem com o plasmídeo pUFR047 ou pBRA vazio; M, mutante; C, mutante complementado. As cepas foram inoculadas em

meio SB 0,5% ágar para complementações em pUFR047, e SB 0,5% ágar suplementado com 0.3% L-arabinose para complementações em pBRA. Os inóculos foram crescidos a 30 °C por 3 dias.

A maioria das cepas com deleções dos genes codificadores para diguanilato ciclases não mostrou uma alteração significativa da mobilidade nessas condições testadas. Por isso foi realizada uma tentativa de super-expressão de alguns destes genes na cepa selvagem de XAC. A super expressão de XAC0258_{GGDEF} e XAC0424_{GGDEF} promoveu uma redução acentuada da mobilidade enquanto a super expressão de XAC1887 (uma fosfodiesterase com domínio EAL) aumentou a mobilidade das células de XAC (Figura 59).

Figura 59. Efeito da super expressão de genes envolvidos no metabolismo de c-diGMP na cepa selvagem XAC. Os genes XAC0258, XAC0593, XAC1486 e XAC1887 foram fusionados ao promotor induzível por L-arabinose (BAD), e a construção obtida foi usada para transformar XAC. As cepas foram inoculadas no meio SB 0,5% ágar com 0.3% L-arabinose e crescidas por 2 dias a 30 °C. A cepa selvagem contendo o plasmídeo pBRA vazio foi inoculada na parte de cima de cada placa, e a cepa selvagem contendo a construção do gene fusionado ao promotor BAD foi inoculada em duplicata na parte inferior de cada placa.

4.2.7. Quantificação de c-diGMP nos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp de XAC

Fenótipos de redução da mobilidade e virulência estão ligados ao aumento da concentração de c-diGMP em células bacterianas. Para verificarmos se as deleções de *rpfG* e *clp* promoveram um aumento da concentração de c-diGMP nas células de XAC, extraímos e separamos os componentes resultantes da lise celular por HPLC e confirmamos a identidade do c-diGMP por ESI-MS/MS. A quantificação do c-diGMP foi baseada na curva obtida no ESI-MS/MS onde relacionamos as áreas dos picos com as concentrações conhecidas de c-diGMP. No início da extração as amostras foram contaminadas com uma concentração

conhecida de AMP cíclico (cAMP) para estimar a taxa de perda de nucleotídeos durante o processo de extração. O uso de cAMP para estimar a perda foi possível porque os nucleotídeos c-diGMP e cAMP apresentam tempos de retenção diferenciados no nosso método de separação (Figura 60), e ainda não foi demonstrado que *Xanthomonas* seja capaz de sintetizar cAMP. Os valores das concentrações de c-diGMP obtidas para cada cepa corresponde a média de 3 experimentos independentes (Figura 61).

A análise quantitativa de c-diGMP confirmou um aumento da concentração de aproximadamente 4.5 vezes deste nucleotídeo no nocaute $\Delta rpfG$, e a sua complementação com a construção pUFR047-*rpfG* restaurou os níveis normais de c-diGMP (Fig. 61). Contudo as concentrações de c-diGMP no mutante Δclp praticamente não se modificaram (Fig. 61). Estes resultados indicam a importância da atividade de fosfodiesterase do domínio HD-GYP de RpfG para reduzir a concentração de c-diGMP nas células de XAC.

Figura 60. Cromatograma mostrando a separação dos nucleotídeos GTP, c-diGMP e cAMP por HPLC usando coluna Phenomenex C18 (250mm x 4,6 mm x 5 μ m) de acordo com método de separação descrito na seção 3.13. Os tempos de retenção para GTP, c-diGMP e cAMP foram, respectivamente: 6 min, 20 min e 22 min.

Figura 61. Quantificação de c-diGMP por HPLC-ESI-MS/MS em diferentes cepas de XAC. Wt, selvagem; rpfG-, nocaute $\Delta rpfG$; rpfG+, nocaute $\Delta rpfG$ complementado com pUFR047-*rpfG*; clp, nocaute Δclp .

4.2.8. Diferenças observadas entre as mobilidades de XAC e XCC

Nas seções anteriores demonstramos que a mobilidade de XAC no meio SB 0,5% ágar é regulada negativamente pelo aumento da concentração de c-diGMP, visto que a super-expressão de proteínas GGDEF (diguanylate ciclase) ou deleção de *rpfG* (fosfodiesterase) reduzem a mobilidade de XAC. Também demonstramos que nocautes de genes codificadores do pilus tipo IV (PT4) tiveram sua mobilidade aumentada nessas condições, assim como a deleção do gene *fhaB* em XAC que codifica uma adesina filamentosa (Gotting et al, 2009). Adicionalmente, a mobilidade de XAC nas condições testadas parece ser regulada positivamente pela goma xantana (Figura 55, seção 4.2.5) (Gotting et al, 2009). Diferentemente dos fenótipos observados para os mutantes do PT4 em XAC, Ryan *et al* (2006, 2007) mostrou que em XCC a mobilidade é dependente do PT4 no meio Eiken ágar, sendo esta ativada pela via Rpf.

Alguns trabalhos descrevem que a mobilidade de XCC dependente de flagelo é ativada pela via Rpf que promove a expressão de *fliC* através do fator transcricional Clp (He *et al.*,

2007; Lee *et al.*, 2003). No caso de XAC a deleção dos genes *rpfF*-C-G resultou na redução da mobilidade mas o nocaute de *fliC* não teve a mobilidade alterada no meio SB 0,5% ágar (Fig. 55, seção 4.2.5). A cepa carregando as deleções $\Delta fliC\Delta pilT$ manteve o fenótipo com aumento da mobilidade em SB similar aos mutantes dos genes codificadores do T4P - $\Delta pilB$, $\Delta pilL$ e $\Delta pilT$ (seção 4.2.5). Deste modo, os genes *rpf* e o PT4 parecem regular a mobilidade de XAC e XCC de maneira diferenciada. Para confirmar esses resultados nos realizamos a complementação do nocaute para $\Delta pilT$ em XAC restaurando o fenótipo WT (Fig. 58, seção 4.2.5). Adicionalmente, obtivemos o nocaute de $\Delta pilB$ tanto para XAC quanto para XCC e comparamos a mobilidade desses mutantes nos meio semi-sólidos SB e Eiken ágar (Figuras 62A e 62B, respectivamente). De modo interessante a cepa carregando as deleções de $\Delta pilB\Delta gumD$ em XAC não mostrou aumento de mobilidade confirmando que a mobilidade observada no mutante $\Delta pilB$ de XAC é de fato dependente da produção de goma xantana nessas condições (Fig. 62A e 62B). O mutante $\Delta pilB$ em XCC teve a mobilidade reduzida em meio Eiken ágar (Fig. 62A), o que corrobora com os resultados publicados por Ryan *et al.* (2006).

Figura 62. Comparação dos fenótipos de mobilidade entre as cepas de XAC e XCC nos meios **A)** Eiken 0.6% ágar e **B)** SB 0,5% ágar. Cepa selvagem (WTxac) e mutantes *pilB*-xac, *gumD*-xac e *pilB/gumD*-xac de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (XAC), e selvagem (WTxcc) e mutante *pilB*-xcc de *Xanthomonas campestris campestris* (XCC).

Mutantes para genes codificadores de proteínas diguanilato ciclases (GGDEF), com exceção de XAC2382, mostraram nenhuma ou pouca diferença de mobilidade em relação à cepa selvagem de XAC nas condições testadas. Somente quando realizamos a super expressão de algumas proteínas GGDEF observamos redução de fato na mobilidade. Para verificar se a deleção de dois genes codificadores para proteínas GGDEF tem algum efeito no fenótipo de mobilidade produzimos cepas mutantes carregando as deleções Δ XAC0258 Δ XAC0424, Δ XAC0258 Δ XAC1940 e Δ XAC0258 Δ XAC1420. Somente a cepa Δ XAC0258 Δ 1940 mostrou um aumento na significativo da mobilidade enquanto Δ XAC0258 Δ XAC1420 teve a mobilidade reduzida e Δ XAC0258 Δ XAC0424 não mostrou alteração (Figura 63). Esses resultados indicam que subconjuntos de diguanilato ciclases podem compartilhar regulações de diferentes fenótipos em XAC, isto é, pode haver sobreposição de vias de sinalização regulando um mesmo fenótipo.

A)

B)

Figura 63. A) Verificação da mobilidade no meio SB 0,5% dos mutantes carregando deleções para genes codificadores de proteínas diguanilato ciclases. Wt, cepa selvagem; M, cepa carregando as deleções de dois genes codificadores de proteínas GGDEF. Os genes deletados encontram-se indicados abaixo de cada placa. B) Domínios que constituem as diguanilato ciclases XAC0258, XAC0424, XAC1420 e XAC1940 baseado no programa Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). GGDEF, diguanilato ciclase; C-NMP, domínio de ligação a nucleotídeo; HDOD, pertencente à superfamília dos domínios HD que possuem atividade de fosfohidrolase; B-propeller, domínio envolvido na interação proteína-proteína; YYY, domínio com três resíduos de tirosinas conservadas em tandem que podem ser fosforiladas regulando a atividade enzimática.

Nossos resultados demonstram que a mobilidade de XAC nas condições testadas, diferentemente de XCC, é independente do flagelo, regulada negativamente por PT4 e dependente da produção de goma xantana. A mobilidade independente de aparatos como pilus e flagelo, mas dependente de surfactantes, por exemplo, ocorre quando as células se movem de modo passivo deslizando sobre a superfície do meio (mobilidade tipo *sliding*). A mobilidade tipo *sliding* foi descrita para algumas bactérias como *P. aeruginosa* e *Mycobacterium smegmatis* (Murray and Kazmierczak, 2008; Mathew *et al.*, 2006).

A atuação positiva da goma xantana sobre a mobilidade de XAC pode ser evidenciada na Figura 64. A colônia do mutante $\Delta rpfF$, que não produz o sinal do *quorum-sensing*, DSF, apresenta uma diminuição da mobilidade. Observamos que a mobilidade de $\Delta rpfF$ pode ser recuperada por DSF produzido na cepa mutante $\Delta rpfC$. DSF que se difunde no meio SB, a partir da colônia de $\Delta rpfC$, atinge as células na borda da colônia de $\Delta rpfF$. O fenótipo gomoso, e consequentemente a dispersão celular, reaparece na borda da colônia de $\Delta rpfF$ mais próxima da colônia de $\Delta rpfC$ (Fig. 64).

Figura 64. A mobilidade no meio SB 0,5% ágar é ativada no nocaute $\Delta rpfF$ quando sua colônia está localizada próxima a colônia do mutante $\Delta rpfC$. Wt, selvagem; $rpfF^-$, nocaute $\Delta rpfF$; $rpfC^-$, nocaute $\Delta rpfC$.

4.2.9. Microscopia eletrônica de transmissão dos mutantes de XAC

Células de XAC crescidas durante 2 e 3 dias no meio SB 0,5% ágar foram coletadas e preparadas para serem analisadas em microscópio eletrônico de transmissão no laboratório do Prof. Dr. Kitajima (Laboratório de microscopia, Esalq-Piracicaba/SP).

Na superfície das células da cepa selvagem (WT) e super-expressão de *rpfG* foram observados PT4 e flagelo (Figura 65). Nos nocautes que apresentaram um aumento da mobilidade $\Delta XAC2382$, $\Delta pilL$ e cepa carregando as deleções $\Delta XAC0258\Delta XAC1940$ observamos a presença de flagelo mas não PT4 (Fig. 65). Também foi observado flagelo no mutante *rpfG*, o qual mostrou redução da mobilidade enquanto o nocaute $\Delta fliC$ não exibiu flagelo nem pilus (Fig. 65). Dessa forma, a presença de flagelo foi confirmada tanto nas cepas mutantes que apresentaram a mobilidade aumentada ou reduzida no meio SB. Indicando que a presença ou ausência do flagelo não está relacionada com as alterações de mobilidade descritas para esta condição. Devido ao tratamento das células para obtenção de contraste na microscopia eletrônica de transmissão, a estrutura do flagelo não se manteve intacta, sendo possível observar somente a base do flagelo nas superfícies celulares (Fig. 65)

Figura 65. Observação por microscopia eletrônica de transmissão dos aparatos pilus tipo 4 e flagelo nas superfícies celulares das cepas (Azul) que mostraram aumento da mobilidade (Vermelho) redução da mobilidade e (Preto) sem alteração da mobilidade no ensaio em SB 0,5% ágar. A seta vermelha indica na figura o pilus, e seta verde flagelo. Barras de tamanho estão entre 0,1 μ e 0,5 μ .

4.10. Produção de goma xantana nos nocautes com a mobilidade alterada: $\Delta rpfG$ e $\Delta pilT$

Nossos resultados mostraram que o nocaute *gumD* (XAC2583) apresenta a mobilidade reduzida nos meios SB e Eiken (Figuras 55 e 62). Estas observações permitem sugerir que a goma xantana contribui de maneira importante na mobilidade de XAC em superfícies semi-sólidas. Para verificar se o aumento da mobilidade de $\Delta pilT$ está diretamente relacionada ao aumento de produção de goma neste mutante quantificamos a goma xantana presente nos sobrenadantes de $\Delta rpfG$, $\Delta pilT$, $\Delta gumD$ e cepa selvagem de XAC. A porcentagem de goma produzida pela cepa $\Delta rpfG$ foi de aproximadamente 40% menos em relação ao selvagem

(Figura 66). Através deste ensaio verificamos também que $\Delta pilT$ apresenta um aumento de 26% da produção de goma com relação a cepa selvagem (Fig. 66). Adicionalmente, a complementação de $\Delta rpfG$ não restaurou apenas a mobilidade mostrado na Figura 58, mas também a produção de goma xantana (Fig. 66). O PT4, assim como as fímbrias adesivas, pode funcionar como um aparato de agregação entre as células de XAC, ou entre a célula de XAC e o meio semi-sólido, reduzindo a sua mobilidade tipo *sliding* (Gottig *et al.*, 2009; Guzzo *et al.*, 2009).

Figura 66. Efeito das mutações sobre a produção de goma xantana em XAC. O mutante $\Delta pilT$ mostra um aumento na produção de goma xantana, a deleção de $rpfG$ reduziu a produção do exopolissacarídeo. O nocaute $\Delta gumD$ praticamente não apresentou goma xantana em seu sobrenadante. A complementação do nocaute $\Delta rpfG$ restaurou a produção de goma xantana. As cepas foram crescidas no meio 2xTY suplementado com 1% sacarose a 30 °C até $D_{0600\text{ nm}}$ 3. Wt, cepa selvagem de XAC; Cepas mutantes: gumD-, rpfG-, pilT; Cepa complementada, rpfG+.

4.2.11. Expressão do promotor gum nos nocautes com mobilidade alterada

Como demonstrado nas seções anteriores, a mobilidade de XAC nos meios semi-sólidos SB e Eiken parece ser dependente da produção de goma xantana, visto que mutantes que tiveram sua mobilidade aumentada apresentaram maior produção de exopolissacarídeos no sobrenadante e o mutante $\Delta gumD$ mostrou a sua mobilidade reduzida significativamente.

Para verificarmos se a expressão do operon *gum* é alterada nas células dos nocautes Δclp , $\Delta rpfG$ e $\Delta pilT$, foi construída uma fusão do promotor *gum* com o gene repórter *gus* (*uid*) de *E. coli*. Esta construção foi clonada no vetor pUFR047. As cepas selvagem e mutantes de XAC foram transformadas com esta construção e a atividade de GUS foi quantificada por ensaio colorimétrico (Figura 67). Os resultados obtidos apontam uma maior atividade de GUS (β -glucuronidase) no nocaute $\Delta pilT$, e menor atividade para os nocautes $\Delta rpfG$ e Δclp . Portanto, a expressão do promotor *gum* é maior no mutante $\Delta pilT$ que também mostrou um aumento da mobilidade e na produção de goma xantana.

Figura 67. A) Fusão transcricional do promotor do operon *gum* no gene repórter *gus* (*uidA*), gerando a construção pUFR047-*gum*::*gus*. B) Quantificação da expressão de pUFR047-*gum*::*gus* nas cepas selvagem (Wt) e nocautes (*clp*-, *rpfG*-, *pilT*-) de XAC. Como controle foi usado a cepa selvagem de XAC contendo o vetor pUFR047 com o gene *gus* (*uid*) sem o promotor *gum* de XAC. A quantificação foi realizada de acordo com (Egener *et al.*, 2002).

4.2.12. Análise da produção de endoglucanases nos mutantes envolvidos com a via de *quorum-sensing* em XAC

A produção de endoglucanases no sobrenadante das cepas selvagem e mutantes foi verificada de acordo com o ensaio que mede o halo de degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC) (Tang *et al.*, 2001). A Figura 68 apresenta os resultados das atividades de endoglucanases obtidas para as deleções de genes que participam da via Rpf, e que codificam as diguanilato ciclasas que interagiram com RpfG (Andrade *et al.*, 2006).

Figura 68. Produção de endoglucanases para cepas carregando deleções para genes envolvidos com a sinalização Rpf e codificadores de diguanilato ciclasas que interagiram com RpfG. As culturas foram crescidas em meio 2xTY a 30 °C na DO_{600 nm} 2. A atividade de endoglucanase dos sobrenadantes das culturas da cepa selvagem foi comparada com a atividade dos sobrenadantes das culturas das cepas mutantes. Cepa de XAC selvagem, WT; Cepas mutantes, o gene deletado encontra-se indicado na figura.

Para confirmar a diminuição de endoglucanases nos sobrenadantes dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp , realizamos os mesmos ensaios nas cepas complementadas. A complementação dos mutantes restaurou a capacidade de degradar CMC (Figura 69). No caso de Δclp complementado com pBRA-*clp* observamos um aumento de aproximadamente 30% da

atividade de endoglucanases comparado com a cepa selvagem (Fig. 69). Esta observação sugere que Clp atua regulando diretamente a expressão de endoglucanases nas células de XAC, assim como demonstrado para XCC (Hsiao *et al.*, 2005).

A super-expressão da diguanilato ciclase XAC0424 na cepa selvagem reduziu em 85% a produção de endoglucanases em XAC (Fig. 69). Adicionalmente, o fenótipo do mutante $\Delta rpfG$ foi parcialmente revertido com a super-expressão do seu domínio HD-GYP (Fig. 69), e a super-expressão de outra fosfodiesterase XAC1887 recuperou totalmente a produção de endoglucanases em $\Delta rpfG$ (Fig. 69). Por outro lado, XAC1887 não foi capaz de recuperar a produção de endoglucanases em Δclp , indicando que o fator transcricional Clp está diretamente envolvido com a expressão ou secreção de endoglucanases nas células de XAC. Esses resultados corroboram para uma regulação negativa de c-diGMP sob a produção de endoglucanases, visto que a super-expressão das fosfodiesterases RpfG (inteira ou apenas seu domínio HD-GYP) e XAC1887 recuperaram a atividade de endoglucanase em $\Delta rpfG$ e a super-expressão da diguanilato ciclase XAC0424 reduziu esta atividade significativamente.

Figura 69. Efeito da super expressão da diguanilato ciclase (XAC0424) e complementações dos nocautes $\Delta rpfG$ e Δclp na produção de endoglucanases em XAC. A atividade de endoglucanases da cepa selvagem (WT) contendo o plasmídeo pBRA vazio foi comparada com a atividade da cepa selvagem super-expressando a diguanilato ciclase XAC0424 (pBRA-XAC0424). O nocaute $\Delta rpfG$ foi complementado com as construções pBRA-*rpfG*, pBRA-HD-GYP e pBRA-XAC1887. Para a complementação do mutante Δclp usamos as construções pBRA-*clp* e pBRA-XAC1887. As culturas foram crescidas no meio 2xTY suplementado com 0.3% L-arabinose a 30 °C e DO_{600nm} 2. A atividade de endoglucanase no sobrenadante de cada cultura foi determinada de acordo com (Tang *et al.*, 1996) e expressa em função da atividade apresentada pela cepa selvagem.

4.2.13. Análise da produção de proteases extracelulares nos mutantes envolvidos com via de quorum-sensing em XAC

O ensaio para verificar a produção de proteases extracelulares foi realizado em placas contendo o meio LB suplementado com 1% de leite em pó desnatado. O tamanho do halo de degradação da caseína em volta das colônias de XAC indicou a atividade de proteases extracelulares nos mutantes. A análise de produção de proteases extracelulares nos mutantes demonstrou que os genes *rpfG* e *clp* atuam como reguladores positivos na produção destes fatores de virulência em XAC (Figuras 70A e 70B).

O mutante $\Delta rpfG$ foi complementado com as construções pBRA-*rpfG*, pBRA-HDGYF e pBRA-XAC1887 (Fig. 70A). A produção de proteases extracelulares pelo mutante

Δclp foi restaurada com a construção pBRA-*clp*, mas não com pBRA-XAC1887 (Fig. 70B). De modo interessante foi observado o aumento acentuado da atividade de proteases extracelulares na complementação do nocaute Δclp por pBRA-*clp* (Fig. 70B). Adicionalmente, a super expressão da diguanilato ciclase XAC0424 na cepa selvagem reduziu a sua produção de proteases extracelulares (Fig. 70C). Esses resultados indicam que a via Rpf, juntamente o fator transcricional Clp, desempenham um papel primordial regulando a produção de enzimas extracelulares em XAC. Além disso, os dados sugerem que Clp controla diretamente a produção de enzimas extracelulares, sendo a sua ativação dependente da atividade das fosfodiesterases RpfG e XAC1887.

A)

B)

C)

Figura 70. Restauração da produção de proteases extracelulares nos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp . **A)** Restauração da produção de proteases extracelulares $\Delta rpfG$ complementado com fosfodiesterases. WT, cepa de XAC selvagem transformada com pBRA vazio; $\Delta rpfG$, mutante com pBRA vazio; $\Delta rpfG$ +pBRA-rpfG, mutante transformado com a construção pBRA-rpfG; $\Delta rpfG$ +pBRA-HDGYP, mutante complementado com a construção pBRA-HDGYP contendo o domínio HD-GYP de RpfG; $\Delta rpfG$ +pBRA-XAC1887, mutante com a construção pBRA-XAC1887. **B)** Restauração da produção de proteases extracelulares em Δclp . Δclp , mutante; Δclp +pBRA-clp, mutante complementado com pBRA-clp; Δclp +pBRA-XAC1887, mutante clp transformado com pBRA-XAC1887. **C)** Redução da produção de proteases extracelulares com a super-expressão de XAC0424 na cepa selvagem. O halo indica a degradação de caseína presente no meio LB suplementado Δclp +pBRA-clp com 1% de leite em pó desnatado e 0.3% L-arabinose para induzir a expressão do promotor BAD. As colônias foram incubadas por 3 dias a 30 °C.

4.2.14. Redução do crescimento dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp no hospedeiro

Os mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp apresentaram a mobilidade comprometida e redução na produção de fatores de virulência (endoglucanases e proteases extracelulares). O crescimento destes mutantes em meio rico não mostrou diferenças significativas em relação à cepa selvagem (Figura 56, secção 4.2.6). Para verificar se as deleções destes genes, que são reguladores da via do *quorum-sensing* em *Xanthomonas*, têm uma taxa de crescimento alterada dentro do hospedeiro, contamos o número de colônias viáveis em diferentes dias após inoculação e construímos as curvas de crescimento (Figura 71A). Os resultados das curvas de crescimento para $\Delta rpfG$ e Δclp confirmam a importância desses genes no desenvolvimento da infecção, sendo que no sexto dia após a inoculação tem-se cerca de 100 vezes menos células dos mutantes em relação ao número de células das cepas selvagem e complementada por cm² do tecido foliar do hospedeiro (Figura 71A). Adicionalmente, observamos que as cepas de XAC selvagem (Wt) e $\Delta rpfG$ complementada com pUFR047-*rpfG* apresentam uma hiperplasia tecidual mais acentuada que os mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp (Figura 71B). Estas alterações no desenvolvimento do cancro cítrico podem estar relacionadas à menor produção de fatores de virulência $\Delta rpfG$ e Δclp .

A)

B)

10 dias após a inoculação

Figura 71. A) Curvas de crescimento dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp no hospedeiro. Wt, cepa selvagem; dG, nocaute $\Delta rpfG$; dclp, nocaute Δclp ; dGComp, nocaute $\Delta rpfG$ complementado com pUFR047-*rpfG*; dclpComp, nocaute Δclp complementado com pUFR047-*clp*. B) Inoculação na folha do hospedeiro (laranja pêra) das cepas de XAC Wt (selvagem), nocaute $\Delta rpfG$, nocaute Δclp e nocaute $\Delta rpfG$ complementado com pUFR047-*rpfG*. Observa-se formação mais acentuada da hiperplasia tecidual nas cepas WT e $\Delta rpfG$ complementada.

4.2.15. Ensaio de EMSA com o promotor do operon *xcs* e Clp recombinante

O fator de transcrição Clp (homólogo a proteína CAP de *E. coli*) liga-se a molécula de c-diGMP, o qual ocasiona uma mudança conformacional e impede a sua ligação nos sítios promotores (Tao *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2010; Leduc and Roberts, 2009). Utilizando todas as sequências descritas como sítios de ligação de Clp em *Xanthomonas*, foi realizada uma análise *in silico* no genoma de XAC buscando estes sítios com o programa RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>). A análise permitiu a identificação de alguns possíveis sítios de ligação de Clp em promotores de genes de XAC (Figura 72). Entre os genes identificados com um sítio de ligação de Clp no promotor e *cut-off* de pelo menos 60% estão *fliC* (XAC1975), endoglucanase (XAC1770), *mcp* (XAC1897), *secY* (XAC0992), *xcsC* (XAC0694), *zur* (XAC2846). Alguns desses homólogos em XCC foram demonstrados ser alvos diretos da regulação de Clp (Ge and He, 2008; He *et al.*, 2007).

Apesar do genoma de XAC e XCC codificarem dois *operons* que formam diferentes sistemas de secreção tipo II, denominados *xcs* e *xps*, a análise de bioinformática nos permitiu identificar um possível sítio de ligação para Clp somente no *operon* de *xcs*. Isto sugere que Clp pode ativar a expressão de todo *operon xcs*, permitindo a secreção de enzimas extracelulares como endoglucanases e proteases extracelulares. O possível sítio de ligação identificado para *xcs* 5' tgcaGGTGCCAGGTGCCGCAaag 3' corresponde a posição -153/-148 do *operon xcs* (XAC0694-XAC0705). Diferente do que encontramos em XAC, este mesmo sítio de ligação a Clp foi identificado no *operon* de *xps* (não de *xcs*) em XCC (Ge and He, 2008).

Para verificar a ligação da proteína Clp de XAC neste sítio e a ação moduladora de c-diGMP sobre a interação de Clp com o DNA, foram realizados ensaios de EMSA (Ensaio para verificar mudança na mobilidade eletroforética) empregando a proteína Clp recombinante purificada. Clp foi incubada com as sondas *xcsC* (XAC0694) e XAC3460

(controle negativo) (Figura 73). A presença de c-diGMP impediu a formação do complexo Clp-DNA(*xcsC*), enquanto o mesmo não ocorreu com cAMP. Esses resultados indicam que numa condição de alta concentração de c-diGMP na célula, por exemplo, no mutante $\Delta rpfG$ ou quando realizamos a super-expressão de proteínas diguanilato ciclases, a ligação de Clp nos sítios promotores específicos pode ser inibida.

Gene	Posição do sítio	Sequência
<i>fliC</i>	-101 / -86	acgcCGTTATTCATCTCAGCagcg
<i>xcsC</i>	-158/-143	tgcaGGTGCCAGGTGCCGCAaacg
<i>celA</i>	-331/-316	tgccGGTGCCGTTGCCCGCAgtgg
<i>secY</i>	-355/-340	gaccGCTGGTCGCGGTCACAaggg
<i>phoA</i>	-51/-36	ccgcGCTGGGTGGTGTACACcga
<i>ampG</i>	-384/-369	aggcTGTGAATTCGTCACAtcgc
<i>clpS</i>	-298/-283	caacTGTGGCAACCGTCACAtcgg
<i>Tsr(mcp)</i>	-40/-25	tcctGGTGCTGGTGGCCGCAttgg
<i>Zur</i> (XAC2846)	-156/-141	ggcaTGGGCAAGGTGCCCCAgccg
<i>lacI</i> (XAC0713)	-66/-51	cgcgTGGGCCTGCCGCCCCAggcc

Figura 72. Possíveis sítios de ligação de Clp identificados através da análise *in silico* do genoma de XAC com o programa RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>). As sequências utilizadas para esta análise foram previamente determinadas para XCC: 5'GCTGG(6N)TCACA3'; 5'TGTGG(6N)TCACA3'; 5'CGTGG(6N)GCACT3'; 3'TGTGA(6N)CGGCA5'; 3'GGTGC(6N)CCGCA5'; 3'TGG GC(6N)GCCA 5'; 3'CGTTA(6N)TCAGC 5'; 3'CTTGA(6N)CTACA 5' (Ge and He, 2008; He *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005; Hsiao *et al.*, 2005).

Figura 73. **A)** Gel SDS-PAGE 15% acrilamida mostrando a purificação de 6HisSUMO-CLP por coluna de afinidade (1), digestão da proteína recombinante 6HisSUMO-CLP com trombina (2) e obtenção de frações com Clp purificadas por gel filtração (3). M, Marcador. **B)** EMSA mostrando a ligação de Clp no sítio identificado no promotor de XAC0694 (*xcsC*). As sondas XAC3460 e XAC0694 foram incubadas com a proteína Clp, Clp mais c-diGMP ou cAMP.

4.2.16. Análise da presença de fatores de virulência nos sobrenadantes e patogenicidade dos nocautes para os sistemas de secreção tipo II (*xcs* e *xps*) de XAC

A secreção de endoglucanases e proteases ocorrem com o reconhecimento de uma sequência sinal das proteínas secretadas pelo aparato de secreção tipo II (SST2). Como descrito na seção anterior, o genoma de XAC possui dois *operons* que codificam dois SST2 diferentes, o *operon xcs* (XAC0694-XAC0705) e o *operon xps* (XAC3534-XAC3544). Produzimos nocautes para *xcsC* e *xpsE* e analisamos a importância destes dois sistemas na secreção de fatores de virulência e patogenicidade de XAC (Figuras 74A, B e C). Os mutantes $\Delta xcsC$ e $\Delta xpsE$ mostraram uma redução na produção de endoglucanases e proteases extracelulares, sendo mais acentuada em $\Delta xpsE$ (Figuras 25A e 25B). Adicionalmente, a inoculação de $\Delta xpsE$ na folha do hospedeiro mostrou um comprometimento maior na formação de hiperplasia tecidual comparado com a cepa selvagem de XAC (Figura 74C).

A)

B)

C)

10 dias após a inoculação

Figura 74. Ensaios para verificar a produção de fatores de virulência nas cepas Wt (selvagem), *rpfG*⁻ (mutante $\Delta rpfG$), *xcsC*⁻ (mutante $\Delta xcsC$) e *xpsE*⁻ (mutante $\Delta xpsE$) **A)** ensaio para endoglucanases. **B)** ensaio para proteases extracelulares. **C)** Ensaio de patogenicidade no hospedeiro (laranja pêra). Wt (selvagem), *xcsC* (nocaute $\Delta xcsC$) e *xpsE* (nocaute $\Delta xpsE$).

4.3. Sistema de sinalização por c-diGMP: proteínas PilZ funcionam como receptores para diGMP cíclico em XAC

O segundo mensageiro c-diGMP controla inúmeros processos celulares em bactérias. Os mecanismos regulatórios envolvendo ligantes e efetores são pobremente conhecidos, apesar de ser evidente que a sinalização por c-diGMP atua em vários níveis incluindo controles de transcrição, tradução, atividade enzimática, secreção de proteínas e estabilidade protéica (Schirmer and Jenal, 2009).

Os domínios PilZs foram descritos como os primeiros receptores de diGMP cíclico através de estudos de bioinformática (Amikam and Galperin, 2006). Este domínio pode estar associado com domínios regulatórios, catalíticos (incluindo domínios GGDEF, EAL e HD-GYP). O primeiro exemplo funcional descrito para um domínio PilZ foi ao contexto como um domínio carboxi-terminal da subunidade BcsA da celulose sintase de *Gluconacetobacter xylinus*, cuja atividade enzimática é regulada pela ligação de c-diGMP neste domínio (Ross *et al.*, 1990). O nome do domínio vem do trabalho de Alm *et al.* (1996) que observou a deficiência na produção do PT4 no nocaute de um gene de *P. aeruginosa*, cuja função não tinha sido determinada naquele momento (Alm *et al.*, 1996a)

Recentemente tem sido determinado funções celulares específicas para domínios PilZ incluindo patogenicidade em hospedeiros animal e planta, mobilidade e síntese de exopolissacarídeos como celulose e alginato (Ryjenkov *et al.*, 2006; Merighi *et al.*, 2007). Contudo, ainda não está resolvido como os diferentes receptores PilZ ligados ao segundo mensageiro c-diGMP regulam proteínas efetoras, e consequentemente diferentes funções celulares (Schirmer and Jenal, 2009).

4.3.1. Ensaio de dois híbridos com os homólogos de PilZ de XAC

O genoma de XAC codifica quatro homólogos de PilZ: XAC1133, XAC1971, XAC3402 e XAC3518. No entanto, conforme demonstrado por nosso grupo (Guzzo *et al.*,

2009) a proteína XAC1133 não possui os resíduos e o sítio de ligação para c-diGMP em sua estrutura tridimensional. Adicionalmente Guzzo *et al* (2009) confirmou interações entre XAC1133_{PilZ} e o domínio EAL de XAC2398 (proteína homóloga a FimX de *Pseudomonas aeruginosa* que apresenta os domínios GGDEF e EAL pouco conservados) e também entre XAC1133_{PilZ} e uma das ATPases do pilus tipo IV. Estas interações proteína-proteína parecem ser importantes para regular a biogênese do PT4 (Guzzo *et al.*, 2009).

Com o intuito de identificar parceiros de interação dos homólogos de PilZ em XAC clonamos XAC1971, XAC3402 e XAC3518 fusionadas ao domínio BD no vetor pOBD. As construções foram usadas contra uma biblioteca de XAC de acordo com (Alegria *et al.*, 2004). Após selecionar as colônias, o DNA plasmidial das leveduras foi extraído e sequenciado para determinar a identidade das presas. Na Tabela 10 estão listadas todas ORFs que interagiram com os homólogos de PilZ de XAC.

As interações observadas entre os domínios PilZ e as presas não foram conclusivas por não mostrar repetições, sendo que na maioria dos casos a interação apareceu somente uma vez. No entanto, a interação entre XAC3402 com o domínio EAL de XAC1938 chamou a atenção por ter sido observada duas vezes e mais importante devido a nossa observação anterior da interação de XAC1133_{PilZ} com o domínio EAL de FimX (Guzzo *et al.*, 2009). Logo, esta nova observação pode estar revelando um padrão geral de interação entre domínios PilZ e EAL em células bacterianas.

Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos para os ensaios de dois híbridos com os domínios PilZ de XAC.

Isclas	Presas (Primeiro resíduo identificado na interação) Número de interações observadas, Nome da proteína
XAC1971 _{PilZ(50-188)}	(202) 1, XAC1595- NAD quinase (117) 1, XAC2348 – Acetilglutamato quinase (ArgB) (1) 1, XAC1659 – Hipotética
XAC3402 _{PilZ(1-115)}	(636) 2 XAC1938 - Diguanilato ciclase com domínio EAL (246) 1, XAC1312 – Aldeido desidrogenase (1) 1, XAC1895 – aceptor de grupos metil (MCP)
XAC3518 _{PilZ(575-672)}	(186) 1, XAC1978 – FlgJ flagelar proteína (530) 3, XAC0330 – CMF (10) 1, XAC3687 – Alanina racemase (síntese de parede celular) (19) 1, XAC0426 – glgB2 (síntese de glicogênio) (685) 1, XAC0145 (198) 1, (203) 1, XAC1322 – LepA (domínio de GTPase)

Como isolamos somente dois clones derivados de XAC1938_{EAL} que interagiram com XAC3402_{PilZ}, realizamos um novo ensaio direto de dois híbridos para confirmar esta interação (Figura 75). A cepa PJ69-4a transformada com as construções pODB-XAC3402 e pOAD-XAC1938_{EAL} foi capaz de crescer no meio seletivo SC-WLHA, enquanto os controles transformados somente com pODB-XAC3402 e pOAD-XAC1938_{EAL} não foram capazes de crescer nesta condição.

Figura 75. A) Ensaio de interação por dois híbrido entre a proteína da família PilZ XAC3402, fusionada ao domínio BD de Gal4, e o domínio EAL de XAC1938 fusionado no domínio AD de Gal4. Para seleção, usamos os meios SC sem trp (-W), sem leu (-L) e sem trp, leu, his e adenina (-WLHA). B) Domínios que compõem a proteína XAC1938. A seta acima do domínio EAL indica aproximadamente a porção do domínio EAL mínima, iniciando no resíduo 636, para interação com XAC3402. C) Comparação entre os resíduos da região amino terminal das proteínas da família PilZ presentes em XAC com os resíduos da família PilZ consenso do Pfam. Em vermelho estão destacados os resíduos que interagem com o c-diGMP. Somente XAC1133 não possui os motivos RxxxR e D/NxSxxG de ligação a c-diGMP.

4.3.2. Proteínas com domínio PilZ atuam regulando a mobilidade em XAC

Analizamos as mobilidades dos mutantes de XAC1971_{PilZ}, ΔXAC3402_{PilZ} e ΔXAC3518_{PilZ} nos meios SB 0.5% ágar e Eiken 0.6% ágar. Os ensaios no meio SB não mostraram alterações significativas na mobilidade destes mutantes. Entretanto, no meio Eiken, ΔXAC3402_{PilZ} apresentou uma pequena redução da mobilidade e a deleção de XAC1971_{PilZ} promoveu um aumento da mobilidade no meio Eiken 0,5% ágar (Fig. 36 e 76). Estas observações sugerem que XAC3402_{PilZ} e XAC1971_{PilZ} exercem, respectivamente uma regulação positiva e negativa sobre a mobilidade de XAC nestas condições.

Outra observação interessante foi a deleção de *XAC1938* (codifica o domínio EAL que interage com *XAC3402_{PilZ}*) que resultou num pequeno aumento na mobilidade de XAC (Fig. 36 e 76). Deste modo, podemos propor que *XAC3402_{PilZ}* ligando-se a c-diGMP regula positivamente a mobilidade de XAC e o domínio EAL de *XAC1938* poderia hidrolisar o c-diGMP ligado em *XAC3402*, inibindo assim a sua ação positiva na mobilidade de XAC.

Figura 76. A deleção dos homólogos de PilZ resultou em alteração da mobilidade de XAC. O mutante Δ *XAC1971_{PilZ}* apresentou um aumento da mobilidade enquanto a deleção de *XAC3402_{PilZ}* reduziu a mobilidade de XAC em relação a cepa selvagem (Wt). Adicionalmente, a deleção de *XAC1938*, fosfodiesterase com o domínio EAL que interagiu com *XAC3402_{PilZ}*, apresentou um pequeno aumento da mobilidade. As cepas foram inoculadas no centro das placas com meio Eiken 0,5% ágar, e crescidas por 3 dias a 30 °C. O nome do gene deletado encontra-se abaixo de cada fotografia.

Como demonstrado na seção 4.2., a deleção dos genes *rpjF*-C-G resultou em mudanças na morfologia da colônia, redução da mobilidade e aumento da concentração de c-diGMP na célula de XAC. Para verificar o papel dos homólogos de PilZ em condições com elevada concentração de c-diGMP na célula, produzimos cepas com deleções simultâneas de *rpjF* e de *pilZ* (*XAC1971_{PilZ}*, *XAC3402_{PilZ}* e *XAC3518_{PilZ}*). Observamos que os fenótipos característicos do nocaute *rpjF* (redução da mobilidade e rugosidade da colônia) foram perdidos nas cepas carregando as deleções Δ *rpjF* Δ *XAC1971_{PilZ}* e Δ *rpjF* Δ *XAC3518_{PilZ}* (Figura 77A e 77B). Essas observações sugerem que *XAC1971_{PilZ}* e *XAC3518_{PilZ}* podem ser

alvos de regulação da via Rpf ou respondem ao aumento global da concentração de c-diGMP na célula de XAC. Adicionalmente, a super-expressão da diguanilato ciclase XAC0424 na cepa mutante $\Delta XAC1971_{pilZ}$ não promoveu nenhuma alteração, mas ocasionou redução acentuada da mobilidade nas cepas $XAC3402_{pilZ}$ e $\Delta XAC3518_{pilZ}$ (Fig. 77C). Esses resultados confirmam que $XAC1971_{pilZ}$ pode responder ao aumento de c-diGMP na célula de XAC (Fig. 77C).

Figura 77. Alteração da mobilidade dos mutantes $\Delta XAC1971_{pilZ}$ e $\Delta XAC3518_{pilZ}$ em cepas que apresentam a concentração de c-diGMP aumentada. **A)** Efeito das deleções de genes homólogos a *pilZ* e *rpfF* na mobilidade de XAC. As cepas foram inoculadas no centro da placa com o meio SB 0,5% ágar e 0,1% vermelho congo. As placas foram incubadas por 2 dias. O nome dos genes deletados em cada cepa encontra-se abaixo das placas. **B)** Efeitos das deleções de genes homólogos a *pilZ* na cepa $\Delta rpfF$. As células foram crescidas em meio SB 0,5% ágar. As placas foram incubadas por 4 dias. No diagrama representativo temos: Wt, cepa de XAC selvagem; M, cepa mutante $\Delta rpfF$ carregando também a deleção de homólogo de *pilZ* identificado abaixo da placa. **C)** Efeito da super-expressão da diguanilato ciclase XAC0424 nas cepas carregando deleções dos homólogos de *pilZ* em XAC. As colônias foram inoculadas em meio SB suplementado com 0.3 % de L-arabinose. As células foram incubadas por 3 dias a 30 °C. No diagrama representativo tem-se: Wt, cepa de XAC selvagem transformada com pBRA vazio; M+424, cepa mutante de homólogo de *pilZ* transformada com a construção pBRA-XAC0424. O gene *pilZ* deletado encontra-se identificado abaixo de cada placa.

Para confirmar o resultado de ganho de mobilidade da cepa carregando as deleções $\Delta rpfF\Delta XAC1971$, nos realizamos a sua complementação com a construção pUFR047- $XAC1971_{P_{ilZ}}$ e observamos a reversão do seu fenótipo para uma mobilidade reduzida com reaparecimento da rugosidade de colônia (características do mutante $\Delta rpfF$) (Figura 78). Portanto, a deleção de $XAC1971_{P_{ilZ}}$ suprime a perda de mobilidade de $\Delta rpfF$.

Figura 78. Complementação da cepa $\Delta rpfF\Delta XAC1971$ com a construção pUFR047- $XAC1971$ retornou com os fenótipos de $\Delta rpfF$. 1, cepa de XAC selvagem; 2, cepa carregando as deleções $\Delta rpfF\Delta XAC1971$; 3, complementação da cepa $\Delta rpfF\Delta XAC1971$ com a construção pUFR047- $XAC1971$.

4.3.3 A deleção de $XAC1971_{P_{ilZ}}$ no mutante $\Delta rpfF$ reduz a agregação celular

Os mutantes $\Delta rpfF$ -C-G em XCC formam agregados celulares quando crescidos no meio líquido L (Crossman and Dow, 2004a). Esta agregação é promovida pela falta de enzimas que são produzidas pela sinalização do *quorum-sensing*, e secretadas no meio de crescimento de *Xanthomonas*. Enzimas extracelulares como a endo-beta-1,4-mananase podem ser essenciais para degradar a matriz de exopolissacarídeo, que envolve as células de *Xanthomonas*, e ativar a dispersão destas células (Dow *et al.*, 2003). Adicionalmente, os mutantes $\Delta rpfF$ -C-G possuem um aumento da concentração de c-diGMP celular, que pode atuar ativando a expressão de genes codificadores de fímbrias adesivas em bactérias, propiciando a adesão entre as células e das células na superfície (Pesavento *et al.*, 2008; Ryan

et al., 2009). Na Figura 79A podemos observar a formação de agregados celulares nas culturas dos mutantes $\Delta rpfF$ e $\Delta rpfC$ de XAC. Resultados semelhantes foram obtidos para culturas de XAC selvagem com a super-expressão da diguanilato ciclase XAC0424 (Figura 54, seção 4.2.5).

De modo interessante a cepa $\Delta rpfF\Delta XAC1971$ praticamente não mostrou formação de agregados celulares em meio líquido (Figura 79B). Entretanto, a complementação da cepa $\Delta rpfF\Delta XAC1971$ somente com a construção pUFR047-XAC1971_{pilZ} retornou ao fenótipo da cepa $\Delta rpfF$, apresentando agregados celulares quando crescida no meio líquido XVM2 (Figura 79B). Estes resultados indicam que XAC1971_{pilZ} responde ao aumento da concentração de c-diGMP na célula e sua atividade pode ser regulada pela via do *quorum-sensing* em XAC.

A)

$\Delta rpfF$

Wt

$\Delta rpfC$

B)

1- $\Delta rpfF$

2- $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{pilZ}$

3- $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{pilZ}$ +
pUFR047-XAC1971_{pilZ}

1

2

3

Figura 79. A agregação celular em XAC é regulada pela via Rpf e XAC1971_{pilZ}. **A)** Os mutantes $\Delta rpfF$ e $\Delta rpfC$ formam agregados celulares no meio XVM2. **B)** A cepa $\Delta rpfF\Delta XAC1971$ apresenta menor agregação celular que $\Delta rpfF$, contudo a transformação de $\Delta rpfF\Delta XAC1971$ com a construção pUFR047-XAC1971 restaura a formação de agregados celulares. As culturas foram crescidas a 30 °C por 16 horas.

4.3.4. Análise genética mostra que XAC1971 pode interagir com c-diGMP

Os membros da família PilZ com capacidade de ligar ao c-diGMP, apresentam na região amino-terminal os motivos RxxxR e D/NxSxxG. A proteína XAC1971_{PilZ} possui nestas posições os resíduos RxxxK e HxSxxG, onde a segunda arginina (R) é substituída por uma lisina (K) e a glutamina (N) por histidina (H). Deste modo, não é fácil prever a capacidade de XAC1971_{PilZ} interagir com a molécula de c-diGMP.

Para verificar se os resíduos RxxxK são importantes para XAC1971_{PilZ} responder ao aumento de concentração de c-diGMP na célula de XAC, foram produzidas duas mutações sítio-dirigidas R73L e K77I (Figura 80A e 80B). O gene *XAC1971*_{PilZ} contendo as mutações foi clonado no vetor de complementação pUFR047. A construção pUFR047-*XAC1971*_{PilZ} contendo as substituições R73L e K77I foi denominada pUFR047-*XAC1971*_{PilZ}-Mut. Esta construção foi usada para complementar a cepa $\Delta rpf\Delta XAC1971$. Na Figuras 81 e 82 observamos o aparecimento de agregados celulares e redução da mobilidade somente em $\Delta rpf\Delta XAC1971$ transformada com a construção pUFR047-*XAC1971*_{PilZ}, mas não com pUFR047-*XAC1971*_{PilZ}-Mut. Devido ao recente depósito da estrutura tridimensional do homólogo de XAC1971_{PilZ} no banco PDB, considerações detalhadas sobre a interpretação destes resultados serão apresentadas na Discussão desta tese.

A)

Mutante	127	AGCGAAGAAACCGGCGAAGACCGGCGGAACCTACCGCTGCTGGTGCAGC	186
XAC1971	2303185	AGCGAAGAAACCGGCGAAGACCGGCGGAACCTACCGCTGCTGGTGCAGCGCATGGACGCC	2303126
Mutante	187	A	246
XAC1971	2303125	AAACTGGATTTGATGCTGGCGCTGATCGGCCGCTGGTGCGCCAGGGCGACAGCGGGCTG	2303066
Mutante	247	AGCCAGGGCATGGTGCATTGGTCGGTACGCGGCATCCGCCTGAGTTGCGCAACCAGCCAC	306
XAC1971	2303065	AGCCAGGGCATGGTGCATTGGTCGGTACGCGGCATCCGCCTGAGTTGCGCAACCAGCCAC	2303006

B)

pUFR047-XAC1971_{PilZ}-Mut - Mutação sítio-dirigida em R73L e K77I

XAC1971_{PilZ}	49	LGQVEDLRSEETGEDRGELPLLVRMDA	108
XAC1971_{PilZ}Mut	67	LGQVEDLRSEETGEDRGELPLLVLMDAILDLMLALIGRLVRQGD	246

Figura 80. Mutações sítio-dirigidas em XAC1971_{PilZ}. **A)** Comparação das sequências de nucleotídeos de XAC1971_{PilZ} e XAC1971_{PilZ} mutado, isto é, contendo as substituições nas bases G175T e A188T. As bases de XAC1971 substituídas estão destacadas em vermelho. **B)** Comparação dos resíduos de aminoácidos entre XAC1971_{PilZ} e XAC1971_{PilZ} mutado, onde R73 foi substituída por L e K77 por I. Os resíduos substituídos estão destacados em vermelho.

- 1- $\Delta rpf\Delta XAC1971_{PilZ}$ +
pUFR047-XAC1971_{PilZ}Mut
2- $\Delta rpf\Delta XAC1971_{PilZ}$
3- $\Delta rpf\Delta XAC1971_{PilZ}$ +
pUFR047-XAC1971_{PilZ}

Figura 81. As substituições R73L e K77I de XAC1971 na construção pUFR047-XAC1971_{PilZ}, produziu pUFR047-XAC1971_{PilZ}Mut. A construção 1) pUFR047-XAC1971_{PilZ}Mut não restaura a formação de agregados celulares na cepa 2) $\Delta rpf\Delta XAC1971_{PilZ}$ com o faz 3) pUFR047-XAC1971_{PilZ}. As culturas foram crescidas no meio XVM2 a 30 °C por 16 horas.

Figura 82. A) A cepa 2) $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{PilZ}$ não tem sua mobilidade reduzida como em $\Delta rpfF$. No entanto, $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{PilZ}$ transformada com 3) pUFR047-XAC1971 $_{PilZ}$ apresenta a mobilidade diminuída no meio SB. B) A transformação de $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{PilZ}$ com a construção 4) pUFR047-XAC1971 $_{PilZ}^{Mut}$, que contem as substituições R73L e K77I em XAC1971 $_{PilZ}$, não reduziu sua mobilidade. 1) Wt, cepa selvagem de XAC. O ensaio de mobilidade foi realizado no meio SB 0,5% ágar e as células incubadas a 30 °C por 3 dias.

4.3.5. Expressão heteróloga e purificação de XAC1971 $_{PilZ}$

Para verificar a capacidade de XAC1971 $_{PilZ}$ interagir com a molécula de c-diGMP, a proteína recombinante 6HisSumoXAC1971 $_{PilZ}$ induzida na cepa de *E. coli* BL21(DE3) foi purificada em coluna de afinidade (Sepharose-Níquel). Em seguida, as frações eluídas foram passadas na coluna de gel filtração (Superdex 200). Alíquotas das frações eluídas da coluna de afinidade e purificadas na coluna de gel filtração foram resolvidas em gel SDS-PAGE 15% acrilamida (Figura 83). De modo interessante, a migração da proteína 6HisSumoXAC1971 $_{PilZ}$ no SDS-PAGE não corresponde ao seu peso molecular de 34,16 KDa, mas sim ao peso molecular de 29 KDa (Fig. 83). O peso molecular da proteína recombinante 6HisSumoXAC1971 $_{PilZ}$ purificada foi confirmada no espectrômetro de massas MALDI-TOF (Amersham Life Science) no laboratório do Prof. Dr. Paolo Di Mascio, IQ-USP. Neste ensaio podemos constatar, conforme o esperado, que a proteína 6HisSumoXAC1971 $_{PilZ}$ possui uma peso molecular de 34,16 KDa (Figura 84). O tratamento da proteína 6HisSumoXAC1971 $_{PilZ}$ purificada com a protease SUMO não foi muito eficiente e ensaios iniciais de dicroísmo

circular para verificar sua interação com c-diGMP não apresentaram mudanças significativas na sua estrutura secundária.

Figura 83. Gel SDS-PAGE acrilamida 15% das frações purificadas de 6HisSumoXAC1971_{PilZ} em coluna de afinidade (frações 1-6), e gel filtração (P e P1). M, corresponde ao marcador de peso molecular (Sigma).

Figura 84. Espectro de massas obtido para fração P1 de 6HisSumoXAC1971_{PilZ} purificada no MALDI-TOF (Amersham Life Science). O m/z 34,16 KDa corresponde a $[6\text{HisSumoXAC1971}_{\text{PilZ}} + \text{H}]^{+1}$.

4.4. Sinalização por *c-diGMP* e o regulador pós-transcricional *CsrA* em XAC

4.4.1. O mutante $\Delta csrA$ de XAC forma agregados celulares

O gene *csrA* de XAC (XAC1743) possui 213 pb e codifica uma proteína com 70 aminoácidos. CsrA_{XAC1743} possui 100% de identidade com CsrA de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (XOO) (HM988729) e *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (XCV) (YP_363507.1), 93% com *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (XCC) 8004 (YP_243576.1) e 74% com *E. coli* K12 CsrA (NP_41716.1).

A deleção de *csrA* foi realizada em XAC através de recombinação homóloga, utilizando o vetor suicida pNPTS138. Foi observada a formação de agregados celulares durante o crescimento do mutante $\Delta csrA$ no meio líquido XVM2, similar ao fenótipo observado para $\Delta rpfG$ (Figura 85A). O fenótipo agregativo aparece quando o processo de dispersão e mobilidade celular é reprimido na célula de *Xanthomonas* (Crossman and Dow, 2004a). A complementação de $\Delta csrA$ com pUFR047-*csrA* reverteu o fenótipo do mutante reduzindo os agregados celulares durante o seu crescimento no meio XVM2 (Fig. 85B).

Figura 85. Formação de agregados celulares no mutante $\Delta csrA$. **A)** Comparação dos agregados celulares formados pelos mutantes $\Delta rpfG$ e $\Delta csrA$. **B)** A complementação de $\Delta csrA$ reduziu a formação de agregados. Wt, cepa de XAC selvagem; $\Delta rpfG$ e $\Delta csrA$, cepas carregando a deleção de *rpfG* e *csrA*, respectivamente; $\Delta csrA+$, cepa $\Delta csrA$ transformada com a construção pUFR047-*csrA*. As culturas foram crescidas no meio XVM2 a 30 °C por 16h.

Para determinar se a deleção de *csrA* pode afetar o crescimento de XAC, analisamos o crescimento das cepas $\Delta csrA$ e selvagem no meio XVM2. A comparação do crescimento destas cepas mostrou que a deleção de *csrA* não afeta o crescimento de XAC nessas condições testadas (Figura 86).

Figura 86. Curva de crescimento das cepas selvagem (Wt) e mutante $\Delta csrA$ de XAC no meio XVM2. As culturas celulares foram crescidas a 30 °C com agitação 200 rpm. Os valores para cada ponto no gráfico correspondem à média de três leituras no espectrofotômetro a 600nm.

4.4.2. A deleção de *csrA* reduz a mobilidade e a produção de exopolissacarídeos em XAC

A mobilidade de $\Delta csrA$ mostrou-se reduzida no meio SB 0,5% ágar, apresentando a colônia um aspecto rugoso e menor diâmetro em relação a cepa de XAC selvagem (Figura 87). A complementação do mutante $\Delta csrA$ com a construção pUFR047-*csrA* restaurou a mobilidade e confirmou que CsrA desempenha um controle positivo sobre a mobilidade de XAC (Fig. 87).

Demonstramos com os resultados descritos na seção 4.2 (Figura 55) que a mobilidade de XAC é atribuída pelo menos em parte pela produção de goma xantana. A complementação de $\Delta csrA$ com pUFR047-*csrA* recuperou a produção de goma xantana (Figura 88). Portanto, CsrA também regula de modo positivo a biossíntese de exopolissacarídeos em XAC.

Figura 87. Efeito da deleção de *csrA* sobre a mobilidade de XAC. 1, cepa de XAC selvagem; 2, $\Delta csrA$; 3, cepa $\Delta csrA$ transformada com a construção pUFR047-*csrA*. As células foram inoculadas no meio SB ágar 0,5% e incubadas a 30 °C por 3 dias.

Figura 88. Redução da produção de goma xantana em $\Delta csrA$. As cepas foram crescidas no meio 2xTY suplementado com 1% sacarose a 30 °C até D_{0600nm} 2. Wt, cepa de XAC selvagem; gumD-, $\Delta gumD$; rpfG-, $\Delta rpfG$; csrA-, $\Delta csrA$; csrA+, cepa $\Delta csrA$ transformada com a construção pUFR047-*csrA*.

4.4.3. A mobilidade de $\Delta csrA$ é restaurada com a super-expressão de fosfodiesterases

A mobilidade de *Xanthomonas* é regulada positivamente pelo sistema *rpf*, que atua promovendo a diminuição de c-diGMP intracelular pela atividade de fosfodiesterase do domínio HD-GYP de RpfG. Devido a redução da mobilidade em $\Delta csrA$, testamos se a super-expressão das fosfodiesterases RpfG e XAC1887 poderia restaurar sua capacidade de dispersar na superfície do meio semi-sólido. Ambas RpfG e XAC1887 suprimiram o fenótipo da deleção de *csrA* em XAC, restaurando a sua mobilidade no meio SB (Figura 89).

A cepa $\Delta csrA$ teve sua mobilidade restaurada tanto transformada com a construção pBRA-*rpfG*, quanto por pUFR047-*rpfG* (Fig. 89). Na primeira construção a expressão de *rpfG* é controlada pelo promotor BAD induzível por L-arabinose e na segunda pelo seu próprio promotor. A transformação de $\Delta csrA$ com pBRA-*clp* não suprimiu sua perda de mobilidade (Fig. 89). Estes resultados sugerem que a deleção de *csrA* pode ter ocasionado um aumento na concentração de c-diGMP na célula comprometendo a mobilidade de XAC.

Figura 89. A mobilidade de $\Delta csrA$ é recuperada com a super-expressão de fosfodiesterases. A super-expressão das fosfodiesterases RpfG e XAC1887 restaurou a mobilidade de $\Delta csrA$. Contudo a super-expressão de *clp* não ativou a mobilidade de $\Delta csrA$. Wt, cepa de XAC selvagem; M, $\Delta csrA$; C, cepa $\Delta csrA$ transformada com as construções pBRA-*rpfG*, pBRA-XAC1887, pBRA-*clp* e pUFR047-*rpfG*. As células foram inoculadas no meio SB 0,5% ágar contendo 0,3% L-arabinose e incubadas por 2 dias a 30 °C.

4.4.4. Determinação da concentração de c-diGMP em $\Delta csrA$

Os resultados na Figura 89 mostraram que a mobilidade de $\Delta csrA$ é restaurada com a super-expressão de fosfodiesterases. Para verificar se os fenótipos observados em $\Delta csrA$ estão relacionados com um aumento da concentração de c-diGMP nas células de XAC, quantificamos o c-diGMP das cepas selvagem, $\Delta csrA$ e $\Delta csrA$ complementada (Figura 90). A quantificação realizada através do método HPLC-MS/MS confirmou um aumento de aproximadamente 2.4 vezes de c-diGMP nas células de $\Delta csrA$. Adicionalmente, a complementação de $\Delta csrA$ reduziu esta concentração para concentração similar na cepa selvagem. Neste ensaio o mutante $\Delta rpfG$ foi utilizado como controle positivo na quantificação de c-diGMP (Fig. 90).

Figura 90. Aumento de c-diGMP nas células de $\Delta csrA$. As diferentes cepas foram crescidas a 30 °C em meio 2xTY até fase estacionária, então as células foram coletas para quantificação do segundo mensageiro por HPLC-MS/MS. O AMP cíclico foi utilizado como padrão interno para calcular a perda durante o processo de extração e fracionamento do c-diGMP. Wt, cepa de XAC selvagem; rpfG-, $\Delta rpfG$; csrA-, $\Delta csrA$; csrA+, $\Delta csrA$ transformado com a construção pUFR047-*csrA*. A quantificação de c-diGMP foi realizada em triplicata com diferentes culturas de XAC.

4.4.1. CsrA é essencial para a virulência de XAC

Investigamos a função de *csrA* no crescimento de XAC dentro do seu hospedeiro. Folhas de laranja pêra (*Citrus sinensis*) foram inoculadas com células da cepa de $\Delta csrA$ e selvagem. O mutante $\Delta csrA$ mostrou uma diminuição dos sintomas que caracterizam o desenvolvimento do cancro cítrico, como redução do encharcamento (*water-soaking*) e ausência de hiperplasia celular no tecido infectado (Figura 91A e 91B). A comparação dos fenótipos da cepa carregando a deleção de *hrcU* com $\Delta csrA$ permite sugerir que CsrA é essencial para a virulência de XAC (Figura 91A). HrcU é um componente do sistema de secreção tipo III, o qual está envolvido com a injeção de fatores de virulência dentro da célula do hospedeiro (Cappelletti *et al.*, 2011).

Finalmente a Figura 8 mostra que a cepa $\Delta csrA$ apresenta uma redução no crescimento dentro do hospedeiro, sendo que seu crescimento é recuperado quando complementado com a construção pUFR047-*csrA* (Figura 92).

Figura 91. O mutante $\Delta csrA$ apresenta patogenicidade reduzida em folhas de laranja pêra. **A)** O mutante $\Delta csrA$ apresenta patogenicidade alterada com redução do encharcamento e hiperplasia tecidual. Adicionalmente, $\Delta hrcU$ além de reduzir o encharcamento e hiperplasia também apresentou pouca clorose no sítio de infecção. **B)** Detalhes da região abaxial da folha onde $\Delta csrA$ foi inoculado. WT, cepa de XAC selvagem; *csrA*, $\Delta csrA$; *hrcU*, mutante não polar de *hrcU*, cedido pela Dra. Paola Cappelletti (Cappelletti *et al.*, 2011). As fotos foram tiradas após sete dias da inoculação.

Figura 92. A) A deleção de *csrA* compromete o crescimento de XAC dentro do hospedeiro. Wt, cepa de XAC selvagem; *csrA*⁻, $\Delta csrA$; *csrA*⁺, $\Delta csrA$ complementado com pUFR047-*csrA*. Os valores obtidos correspondem as médias das inoculações feitas em triplicadas.

4.4.6. CsrA regula positivamente a produção de endoglucanases

Ensaio para investigar o efeito da deleção *csrA* sobre a produção de endoglucanases foram realizados em placas contendo carboximetilcelulose. Os resultados mostram uma menor produção de endoglucanases em $\Delta csrA$ (Figura 93). A complementação de $\Delta csrA$ com pUF047-*csrA* restaurou a atividade de endoglucanases no sobrenadante (Figura 93), confirmando o controle positivo de CsrA na produção de fatores de virulência em XAC.

Os mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp também mostraram uma redução significativa na produção de endoglucanases, sendo que a complementação destes mutantes retornou com a atividade de endoglucanases similar da cepa selvagem (Fig. 93). De modo interessante a deficiência de endoglucanases foi suprimida em $\Delta csrA$ pela expressão em trans das construções pUF047-*rpfG* e pUFR047-*clp* (Fig. 93). Adicionalmente, a análise das atividades de endoglucanases recuperadas pelas cepas Δclp e $\Delta csrA$ transformadas com a construção pUFR047-*clp* revelou uma menor produção de endoglucanases na cepa $\Delta csrA$, enquanto Δclp apresentou um

aumento acentuado (Figuras 93 e 94). Estes resultados sugerem uma possível regulação positiva da proteína CsrA sobre a afinidade de Clp pelos promotores de genes que codificam endoglucanases ou componentes do SST2.

Ensaio para verificar a produção de proteases extracelulares em $\Delta csrA$ também foram realizados, contudo a deleção de *csrA* em XAC, assim como em XCC e XO, não mostrou alteração na atividade de proteases extracelulares (Zhu *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2008) (Figura 43, seção 4.1).

Figura 93. A deleção de *csrA* reduz a produção de endoglucanases em XAC. Os mutantes $\Delta rpfG$, Δclp e $\Delta csrA$ apresentam uma menor produção de endoglucanases quando comparados com a cepa de XAC selvagem (WT). $\Delta rpfG^+$, Δclp^+ e $\Delta csrA^+$ representam os mutantes complementados com as construções pUFR047-*rpfG*, pUFR047-*clp* e pUFR047-*csrA*, respectivamente. A produção de endoglucanases também foi restaurada em $\Delta csrA$ com a expressão em trans de pUFR047-*rpfG* ($\Delta csrA^+rpfG$) e pUFR047-*clp* ($\Delta csrA^+clp$).

Figura 94. Diferenças entre as atividades de endoglucanases nos mutantes Δclp e $\Delta csrA$ de XAC transformados com a construção pUFR047-*clp*. **A)** O fenótipo de $\Delta csrA$ (*csrA*⁻) é suprimido quando transformado com pUFR047-*clp* (*csrA*+*clp*). **B)** A complementação de Δclp (*clp*⁻) ocasiona um aumento significativo na produção de endoglucanases em XAC (*clp*⁺). Os halos observados foram produzidos pela degradação da carboximetilcelulose (CMC) em placas contendo os sobrenadantes das culturas celulares crescidas no meio 2xTY a 30 °C até a DO_{600nm} 2. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas, coradas com vermelho congo 0.1 % e descoloridas com uma solução 1 M de NaCl. Wt, cepa selvagem de XAC; *csrA*⁻, $\Delta csrA$; *clp*⁻, Δclp ; *csrA*+*clp*, $\Delta csrA$ transformado com a construção pUFR047-*clp*. *Clp*⁺, Δclp com a construção pUFR047-*clp*.

4.4.7. Expressão da proteína recombinante 6HisCsrA (XAC1743) em *E. coli* e sua purificação

A orf de *csrA* (XAC1743) foi amplificada do genoma de XAC usando oligonucleotídeos específicos. O fragmento contendo 213 pb foi purificado, clivado com as enzimas NdeI e EcoRI e clonado no vetor de expressão pET28-a (Invitrogen). A construção obtida foi utilizada para transformar a cepa BL21(DE3) de *E. coli*.

A proteína recombinante 6HisCsrA foi induzida em *E. coli* BL21 (DE3), e purificada por afinidade em coluna de níquel, e posteriormente em gel filtração Superdex-75 (Figuras 95A e 95B, respectivamente). Na tentativa de buscar RNA mensageiros de XAC que são regulados por CsrA, as frações 3 e 4 eluídas da coluna de gel filtração foram testadas em ensaio de interação de 6HisCsrA com um extrato de RNA total de XAC. Deste ensaio foram isolados fragmentos de RNA, que em seguida foram usados para síntese de cDNAs. Os quinze cDNAs obtidos foram seqüenciados e suas identidades confirmadas como

codificadores de diferentes regiões do rRNA 16S. Portanto, não conseguimos isolar nenhum fragmento da região 5' de RNA mensageiros neste ensaio.

Figura 95. SDS-PAGE das frações purificadas da proteína recombinante 6HisCsrA. **A)** Frações contendo a proteína recombinante 6HisCsrA eluídas da coluna de afinidade Sepharose-Níquel. **B)** Frações contendo 6HisCsrA eluídas da coluna de gel filtração Superdex-75.

4.5. Sobreposição das vias de sinalização por *c-diGMP* e *(p)ppGpp* em XAC

Pouco é conhecido sobre a resposta de *Xanthomonas* a estresses nutricionais, não existindo nenhum trabalho publicado sobre a produção e sinalização do segundo mensageiro *(p)ppGpp* por este grupo de bactérias. Os resultados que se seguem descrevem as características dos mutantes $\Delta rpoZ$ (XAC3394), $\Delta relA$ (XAC3113) e $\Delta XAC1185$ (homólogo ao domínio fosfohidrolase de SpoT) e a resposta de XAC perante a carência de aminoácidos no meio.

4.5.1. Obtenção do mutante *rpoZ* de XAC

RelA e SpoT são as principais proteínas envolvidas na síntese e degradação de *(p)ppGpp* em bactérias (Dalebroux *et al.*, 2010). No início Trabalhamos para produzir nocautes nestes genes ($RelA_{XAC3113}$ e $SpoT_{XAC3393}$). Tivemos sucesso na obtenção da cepa $\Delta relA$, entretanto a tentativa de produzir o mutante $\Delta spoT$ apresentou resultados inesperados. Para gerar o mutante não-polar de *spoT* (XAC3393) obtivemos uma construção no vetor pNPTS138 conforme descrito em Materiais e Métodos. A construção foi usada para eletroporar células de XAC. Em seguida realizamos a seleção de cepas Kan^{Res} e Sac^{Sen} para a primeira recombinação, e seleção Kan^{Sen} e Sac^{Res} para a segunda recombinação. Após realizar as seleções, a deleção de *spoT* foi analisada por PCR das colônias que perderam a resistência a canamicina e foram capazes de crescer em 5% sacarose. Interessantemente todas as colônias analisadas apresentaram *spoT* intacto no seu cromossomo, mas algumas colônias eram rugosas parecidas com os mutantes $\Delta rpfF$ -C-G (descritos na seção 4.2).

Os fragmentos de 1000 pb *upstream* e *downstream* do gene *spoT* (XAC3393) foram amplificados das colônias rugosas, clonados no vetor TOPO-TA (Invitrogen) e sequenciados. O sequenciamento dos fragmentos *upstream* de *spoT* de todas as colônias rugosas revelou a presença de dois códons de parada de tradução no meio do gene *rpoZ* (XAC3394) que codifica a subunidade ômega (ω) da RNA polimerase (Figuras 96 e 97). A orf de *rpoZ*

(XAC3394) possui 300 pb codificando um proteína de 99 aminoácidos. A deleção de uma base de citosina na posição 128 e a substituição T/C na posição 154, ocasionaram o surgimento de dois códons de parada nas posições 144 e 190 do quadro de leitura, formando um peptídeo de 48 aminoácidos na região amino-terminal com os últimos 5 resíduos substituídos (Figuras 96 e 97). De modo similar, na literatura foi descrito e caracterizado o mutante de *rpoZ* em *Streptomyces kasugaensis*, que devido a deleção de duas bases no gene e consequente *frameshift* a orf de 90 aminoácidos foi reduzida aos 47 aminoácidos da sua extremidade amina (Kojima *et al.*, 2002). A mutação de *rpoZ* em *S. kasugaensis* também apresentou no efeito pleiotrópico com alteração de múltiplos fenótipos (Kojima *et al.*, 2002). Outras tentativas de produzir a cepa $\Delta spoT$ não tiveram sucesso.

Query	1	ATGGCCCGCATTACCGTAGAAGATTGCCTGGAAGTCGTGAACAACCGTTTTGAGCTGGTC	60
Sbjct	4002411	ATGGCCCGCATTACCGTAGAAGATTGCCTGGAAGTCGTGAACAACCGTTTTGAGCTGGTC	4002352
Query	61	ATGATGGCCTCCAAGCGCGCCCGTCAGCTCGCCAACGGCGTGCAGCCGCTGATCGAGAAT	120
Sbjct	4002351	ATGATGGCCTCCAAGCGCGCCCGTCAGCTCGCCAACGGCGTGCAGCCGCTGATCGAGAAT	4002292
Query	121	GCCGACGC-AGCGACAAGCCACCGTGATGGCACCGCGGAGATCGCCGCACGCCGGATC	179
Sbjct	4002291	GCCGACGCAGCGACAAGCCACCGTGATGGCACCGCGGAGATCGCCGCACGCCGGATC	4002232
Query	180	GACAACGCGCTGATCGATGAAGTCGAGAAGGCCGAACGCGAGCGTGCCGAACGCGAAGCG	239
Sbjct	4002231	GACAACGCGCTGATCGATGAAGTCGAGAAGGCCGAACGCGAGCGTGCCGAACGCGAAGCG	4002172
Query	240	CTGGAATGGGCCCGCCCGCAAGTGGTCGCCGACGAAGACATGTCCAAGAACGACGATTGA	299
Sbjct	4002171	CTGGAATGGGCCCGCCCGCAAGTGGTCGCCGACGAAGACATGTCCAAGAACGACGATTGA	4002112

Figura 96. Comparação das sequências de *rpoZ* (XAC3394) com *rpoZ* mutado. Na sequência de *rpoZ* mutado destacam-se em vermelho a deleção da citosina na posição 128 e a substituição T/C na posição 154.

```

atggccgcattaccgtagaagattgcctggaagtcgtgaacaaccgttttgagctggtc
M A R I T V E D C L E V V N N R F E L V
atgatggcctccaagcgcgcccgtcagctcgccaacggcgtgcagccgctgatcgagaat
M M A ↓ S K R A R Q L A ↓ N G V Q P L I E N
gccgacgcagcgacaagcccaccgtgatggcacccgcgcgagatcgccgcacgcccggatcg
A D A A T S P P - W H R A R S P H A G S
acaacgcgcgatcgatgaagtcgagaaggccgaacgcgagcgtgccgaacgcgaagcgc
T T R - S M K S R R P N A S V P N A K R
tggaatgggccgcgcgaagtggtcgccgacgaagacatgtccaagaacgacgattga
W N G P P P K W S P T K T C P R T T I

```

Figura 97. Sequência de aminoácidos codificados pelo quadro de leitura de *rpoZ* mutado. Dois códons de parada presentes na sequência mutada de *rpoZ* estão destacados em vermelho. As setas indicam a posição onde ocorreram a deleção da citosina 128 e a substituição de T/C na posição 154.

4.5.2. *rpoZ* ativa a mobilidade e produção de exopolissacarídeos, e reprime a agregação celular em XAC

Para investigar se a mutação em *rpoZ* afeta o crescimento de XAC, o crescimento das cepas $\Delta rpoZ$ e XAC selvagem foram analisados no meio XVM2, conforme mostrado na Figura 98. A análise de ambos os crescimentos indicam que *rpoZ* não é requerido para o crescimento de XAC no meio XVM2.

Figura 98. Curva de crescimento das cepas selvagem e $\Delta rpoZ$ indicam que as mutações em *rpoZ* não afetam o crescimento de XAC no meio XVM2. Os valores no gráfico correspondem a média de 3 experimentos independentes.

A mobilidade de $\Delta rpoZ$ foi verificada no meio SB 0,5% ágar. Conforme mostrado na Figura 99, a mobilidade de XAC foi reduzida de modo significativo no mutante $\Delta rpoZ$. A complementação de $\Delta rpoZ$ com as construções pUFR041-*rpoZ* e pUFR041-*rpoZ*+*spoT* restauraram a mobilidade do mutante (Figuras 99A e 99B). Portanto a construção contendo somente *rpoZ* pUFR041-*rpoZ* (Fig. 99B) reverteu o fenótipo do mutante *rpoZ*. Esses resultados confirmam que as mutações identificadas em *rpoZ* de XAC não comprometeram *spoT*, apesar de ambos os genes estarem no mesmo operon (XAC3394-XAC3393).

Figura 99. A complementação do mutante $\Delta rpoZ$ restaura a mobilidade. **A) e B)** Mobilidade de XAC em meio SB 0.5 % ágar das cepas 1, selvagem; 2, $\Delta rpoZ$; e 3, $\Delta rpoZ$ complementado com **A)** pUFR047-*rpoZ*+*spoT* e **B)** pUFR047-*rpoZ*.

A redução da mobilidade de $\Delta rpoZ$ pode estar relacionada ao aumento da agregação celular durante o crescimento bacteriano. Para testar esta hipótese as cepas de XAC selvagem e mutante $\Delta rpoZ$ foram crescidas no meio 2xTY até início da fase estacionária, e em seguida um mesmo volume de cada uma destas culturas celulares foi centrifugado e observamos o aparecimento do fenótipo denominado *gum-like* descrito para cepa XC1 de XCC, que se relaciona com o aumento de pequenos agregados celulares no meio (He *et al.*, 2006c) (Figura 100A). A complementação de $\Delta rpoZ$ com a construção pUFR041-*rpoZ* reduziu o fenótipo *gum-like* observado (Fig. 100A). Estas culturas celulares foram analisadas ao microscópio

óptico onde também se observou o mutante $\Delta rpfG$. Neste ensaio confirmamos a presença de agregados celulares em $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpfG$, mas não na cepa selvagem (Figuras 100B e C). Portanto a mutação em *rpoZ* promove o aparecimento do fenótipo *gum-like* e a agregação celular em XAC.

Figura 100. O mutante $\Delta rpoZ$ apresenta os fenótipos *gum-like* e agregação celular. **A)** Células de XAC crescidas no meio 2xTY até $DO_{600\text{ nm}} 2$ foram centrifugadas a 7000 rpm para verificar a agregação celular através do fenótipo *gum-like*. **B)** Culturas de XAC coloridas com cristal violeta e observadas com os aumentos de **B)** 100X e **C)** 400X no microscópio óptico Nikon-E200. Wt, selvagem; $\Delta rpfG$ e $\Delta rpoZ$, cepas mutantes e C, $\Delta rpoZ$ complementado com pUFR047-*rpoZ*.

A produção de exopolissacarídeos em $\Delta rpoZ$ também foi analisada, sendo observada uma redução de aproximadamente 90% de exopolissacarídeos no seu sobrenadante comparado com a produção na cepa de XAC selvagem (Figura 101). Finalmente A complementação de $\Delta rpoZ$ com a construção pUFR047-*rpoZ* restaurou a produção de goma xantana.

Figura 101. Análise da produção de exopolissacarídeos em $\Delta rpoZ$. As bactérias foram crescidas em meio 2xTY com 1% glicose até o início da fase estacionária, então as células foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes foram filtrados, e os exopolissacarídeos foram precipitados com etanol. Os valores representam as médias de 3 experimentos realizados de maneira independente. Wt, selvagem; rpfG, $\Delta rpfG$; gumD, $\Delta gumD$; rpoZ, $\Delta rpoZ$; rpoZ+, $\Delta rpoZ$ complementado com pUFR047-*rpoZ*.

4.5.3. Os fenótipos de mobilidade e agregação celular de $\Delta rpoZ$ são suprimidos pela super-expressão de *rpfG*

A super expressão da fosfodiesterase RpfG no mutante $\Delta rpoZ$, usando a construção pBRA-*rpfG* com *rpfG* fusionado ao promotor BAD, restaurou a mobilidade no meio SBA, que corresponde ao meio SB suplementado de 0.3% L-arabinose (Figuras 102A e 102B). No entanto, a construção pUFR047-*rpfG*, que contém a região codificadora e o próprio promotor de *rpfG*, apesar de ter revertido o fenótipo de $\Delta rpfG$ e suprimido a perda de mobilidade na deleção de *csrA* (ver Figura 89, seção 4.4), não foi capaz de suprimir o fenótipo do mutante *rpoZ* (Figura 102B). Esses resultados sugerem que *rpoZ* pode controlar de modo direto ou indiretamente a expressão de *rpfG*. Corroborando com nossa hipótese a expressão constitutiva de *rpfG* com a construção pMR20lac::*rpfG* restaurou a mobilidade nos mutantes $\Delta rpfG$ e $\Delta rpoZ$ (Figuras 102C e 102D, respectivamente).

Figura 102. Super-expressão de *rpfG* suprime o fenótipo do nocaute *rpoZ* restaurando a mobilidade. **A)** Supressão do fenótipo de $\Delta rpoZ$ com a indução da expressão de *rpfG* no meio SB 0,5% ágar e 0.3% L-arabinose (SBA). Wt, selvagem; M, $\Delta rpoZ$; BAD::G, $\Delta rpoZ$ transformado com a construção pBRA-*rpfG*. **B)** A mobilidade de $\Delta rpoZ$ é restaurada com a construção pBRA-*rpfG*, mas não com a construção pUFR047-*rpfG*, onde *rpfG* esta sobre o controle do seu próprio promotor. Wt, selvagem; BAD::G, $\Delta rpoZ$ transformado com a construção pBRA-*rpfG*. *rpfG*, $\Delta rpoZ$ transformado com pUFR047-*rpfG*. **C)** Complementação de $\Delta rpfG$ com a construção pMR20lac::*rpfG*. A expressão de *rpfG* esta sobre o controle do promotor *lac* que é constitutivo em *Xanthomonas*. Wt, selvagem; M, $\Delta rpfG$; Lac::G, $\Delta rpfG$ transformado com a construção pMR20lac::*rpfG*. **D)** Supressão do fenótipo de $\Delta rpoZ$ com a expressão constitutiva de *rpfG*. Wt, selvagem; M, $\Delta rpoZ$; Lac::G, $\Delta rpoZ$ transformado com a construção pMR20lac::*rpfG*. As células foram inoculadas no meio SB ou SB suplementado com 0.3% L-arabinose (SBA), e incubadas por 3 dias a 30 °C.

Para investigar se a expressão constitutiva de *rpfG* em $\Delta rpoZ$ reduz a agregação celular, desfazendo o fenótipo *gum-like* as cepas de XAC selvagem, $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpoZ$ transformada com as construções pUFR047-*rpoZ* e pMR20-lac::*rpfG* foram crescidas no meio 2xTY suplementado com 1% glicose até início da fase estacionária. As culturas

celulares foram coletadas e centrifugadas. Após as centrifugações observou-se maior formação do fenótipo *gum-like* nos mutantes $\Delta rpfG$ e $\Delta rpoZ$ (Figura 103). As complementações de $\Delta rpfG$ e $\Delta rpoZ$ inibiu o aparecimento do fenótipo *gum-like* (Fig. 103). Assim como a expressão constitutiva de *rpfG* em $\Delta rpoZ$, usando a construção pMR20-lac::*rpfG*, também suprimiu o fenótipo *gum-like* (Fig. 103).

Figura 103. Supressão do fenótipo *gum-like* em $\Delta rpoZ$ pela expressão constitutiva de *rpfG*. Wt, cepa de XAC selvagem; *rpfG*, $\Delta rpfG$; *rpoZ*, $\Delta rpoZ$; *rpfG*+, cepa $\Delta rpfG$ complementada com a construção pMR20-lac::*rpfG*; *rpoZ*+, $\Delta rpoZ$ complementada com pUFR047-*rpoZ*; *rpoZ*+G, $\Delta rpoZ$ transformada com a construção pMR20-lac::*rpfG*.

4.5.4. A deleção de *rpoZ* promove o aumento de c-diGMP na célula de XAC

Demonstramos na seção 4.2 para o mutante $\Delta rpfG$ que o aumento da concentração global de c-diGMP na célula de XAC reprime a mobilidade e ativa a agregação celular. Adicionalmente, a super-expressão de *rpfG* suprimiu os fenótipos de $\Delta rpoZ$, sugerindo que *rpoZ* também regule o metabolismo de c-diGMP em XAC. Para testarmos esta hipótese, culturas de XAC selvagem, $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpoZ$ complementada foram crescidas no meio 2xTY até início da fase estacionária (DO_{600nm} 1.5). As células foram centrifugadas e utilizadas para a extração de nucleotídeos totais, que em seguida foram separados em coluna C18 no HPLC para a quantificação de c-diGMP no espectrômetro de massas ESI-MS/MS. No início da extração, foi adicionada nas amostras uma concentração conhecida de AMP cíclico, o qual

serviu como padrão interno para calcular as taxas de perda durante o processo de extração. O mutante $\Delta rpfG$ foi usado como controle neste ensaio.

As análises dos extratos celulares por HPLC-ESI-MS/MS confirmaram um aumento da concentração de c-diGMP nas células de $\Delta rpoZ$ (Figura 104). De fato, o mutante $\Delta rpoZ$ apresentou um aumento de aproximadamente 2 vezes, enquanto $\Delta rpfG$ mostrou um aumento de 4.5 vezes da concentração de c-diGMP encontrada nas células de XAC selvagem (Fig. 104).

A complementação de $\Delta rpoZ$ reduziu a concentração de c-diGMP, retornando para a concentração similar a encontrada na cepa selvagem (Fig. 104). Deste modo, podemos atribuir, pelo menos em parte os fenótipos de redução da mobilidade e agregação celular de $\Delta rpoZ$ ao aumento da concentração de c-diGMP em XAC.

Figura 104. *rpoZ* regula a concentração de c-diGMP na célula de XAC. Wt, selvagem; rpfG-, $\Delta rpfG$; rpfG+, complementação $\Delta rpfG$ com a construção pUFR047-*rpfG*; rpoZ-, $\Delta rpoZ$; rpoZ+, $\Delta rpoZ$ complementado com pUFR047-*rpoZ*. Os valores correspondem as médias de três experimentos independentes.

4.5.5. *rpoZ* é essencial para o crescimento de XAC no hospedeiro

A inoculação do mutante $\Delta rpoZ$ em folhas de laranja pêra (*Citrus sinensis*) revelou uma perda significativa da patogenicidade por este mutante com ausência de encharcamento, hiperplasia tecidual e clorose no local da infecção (Figura 105A). A complementação de $\Delta rpoZ$ com pUFR047-*rpoZ* restaurou a patogenicidade confirmando que *rpoZ* é essencial para XAC desenvolver os sintomas do cancro cítrico (Fig. 105A). A comparação das curvas de crescimento das cepas de XAC selvagem, $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpoZ$ complementada demonstrou que *rpoZ* é requerido para a sobrevivência de XAC dentro do hospedeiro (Fig. 105B).

Figura 105. *rpoZ* é essencial para o crescimento de XAC dentro do hospedeiro. **A)** Inoculação de $\Delta rpoZ$ em folha de laranja pêra mostrando a perda da patogenicidade. Wt, selvagem; rpoZ, $\Delta rpoZ$; rpoZ+, $\Delta rpoZ$ complementada com pUFR047-*rpoZ*. **B)** Curvas de crescimento em folhas de laranja pêra das cepas de XAC selvagem (WT), $\Delta rpoZ$ (rpoZ) e $\Delta rpoZ$ complementada (rpoZ+).

A construção pRM20-*lac::rpfG* restaurou a mobilidade e inibiu a formação do fenótipo *gum-like* no mutante $\Delta rpoZ$. Contudo a cepa $\Delta rpoZ$ transformada com pRM20-*lac::rpfG* não teve a patogenicidade recuperada (Figura 106). Este resultado levanta a hipótese que o controle da patogenicidade por *rpoZ* pode ser realizado sobre a expressão de genes que

codificam o aparato de secreção III (SST3) ou ainda por promover o crescimento de XAC no tecido do hospedeiro, regulando, por exemplo, *operons* envolvidos na biossíntese de aminoácidos.

10 dias após inoculação

Figura 106. A expressão constitutiva de *rpfG* em $\Delta rpoZ$ não restaura a patogenicidade. Wt, XAC selvagem; *rpoZ*, $\Delta rpoZ$; *rpoZ*+, $\Delta rpoZ$ complementada com pUFR047-*rpoZ*; Lac::G, $\Delta rpoZ$ transformada com a construção pMR20-*lac::rpfG*. A foto foi obtida 10 dias após a inoculação das cepas em folhas de laranja pêra.

4.5.6. *rpoZ* regula positivamente a produção de enzimas extracelulares em XAC

Para verificar se a perda da patogenicidade em $\Delta rpoZ$ está relacionada com a redução na produção de enzimas extracelulares, determinou-se a atividade de endoglucanases e proteases presentes no sobrenadante das cepas selvagem e $\Delta rpoZ$. A análise dos resultados mostrou uma diminuição significativa da atividade de endoglucanases e proteases extracelulares em $\Delta rpoZ$ (Figuras 107A e 107B). A complementação do mutante $\Delta rpoZ$ com a construção pUFR047-*rpoZ* restaurou a produção de endoglucanases e proteases extracelulares, confirmando a regulação positiva de *rpoZ* sobre a produção de fatores de virulência (Figuras 107A e 107B). Adicionalmente, a expressão constitutiva de *rpfG* na cepa

$\Delta rpoZ$, transformada com a construção pRM20-lac::rpfG, suprimiu o fenótipo do mutante restaurando a produção de enzimas extracelulares (Figuras 108A e 108B).

A redução da mobilidade e produção enzimas extracelulares em $\Delta rpoZ$ sugerem que a subunidade ω da RNA polimerase pode atuar, juntamente com a via de *quorum-sensing* (*rpf*), regulando a expressão ou ativação de fatores envolvidos no metabolismo de c-diGMP, biossíntese de goma xantana e produção de fatores de virulência nas células XAC.

Figura 107. *rpoZ* regula positivamente a produção de enzimas extracelulares em XAC **A)** endoglucanases e **B)** proteases extracelulares. As células foram crescidas em meio 2xTY a 30 °C até início da fase estacionária. Para o ensaio de endoglucanases os sobrenadantes foram separados das células por centrifugação, em seguida foram filtrados em filtro 0.45 μ m (Millipore). O halo em A mostra a degradação da carboximetilcelulose (CMC) por endoglucanases do sobrenadante. Para o ensaio de proteases a mesma quantidade de células foi inoculada no meio LB 1,5% ágar contendo 1% leite em pó. O halo em B representa a degradação da caseína por proteases extracelulares de XAC. Wt, cepa de XAC selvagem; *rpoZ*, $\Delta rpoZ$; *rpoZ*+, $\Delta rpoZ$ complementada com pUFR047-*rpoZ*.

Figura 108. Supressão do fenótipo de $\Delta rpoZ$ com a expressão constitutiva de *rpfG*. A cepa $\Delta rpoZ$ transformada com a construção pRM20-lac::*rpfG* teve restauradas as produções de **A)** endoglucanases e **B)** proteases extracelulares. As culturas foram crescidas em meio 2xTY a temperatura de 30 °C. Os sobrenadantes das culturas crescidas até o início da fase estacionária foram filtrados e usados nos ensaios de endoglucanases. O halo em A mostra a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC). A mesma quantidade de células foi inoculada no meio LB 1.5% ágar suplementado com 1% leite em pó. O halo de degradação em B indica a degradação da caseína por proteases extracelulares de XAC. Wt, cepa de XAC selvagem; *rpoZ*, $\Delta rpoZ$; *rpfG*, $\Delta rpoZ$ transformada com pRM20-lac::*rpfG*.

4.5.7. Acúmulo reduzido de (p)ppGpp no mutante $\Delta rpoZ$ em condições de resposta severa

A subunidade ω estabiliza o complexo multiprotéico que forma o *cerne* da RNA polimerase aumenta a afinidade do *cerne* por (p)ppGpp e também regula indiretamente a produção de (p)ppGpp por ativar a expressão de *relA* (Chatterji *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2010; Vrentas *et al.*, 2005a). RelA é a principal enzima envolvida na produção de (p)ppGpp durante a resposta estrigente em bactérias Gram-negativas (Potrykus and Cashel, 2008)). Para investigar se o mutante $\Delta rpoZ$ apresenta alteração no acúmulo de (p)ppGpp perante a carência de aminoácidos, foram realizados ensaios de CCD (cromatografia de camada delgada) com os extratos de células crescidas em meio mínimo suplementado com ^{32}P e serina hidroxamato (SHM). SHM interrompe a síntese de proteínas por liga-se de forma estável a seril-tRNA sintetase mimetizando a ativação do sinal de

carência de aminoácidos na célula e inibindo o crescimento bacteriano (Haddadin *et al.*, 2009). Adicionalmente, para verificar se RelA é a principal enzima produtora de (p)ppGpp durante a resposta estrigente em XAC, produzimos o mutante $\Delta relA$. O acúmulo de (p)ppGpp também foi analisado no mutante $\Delta rpfG$ de XAC.

Os resultados dos ensaios em CCD mostram que *rpoZ* regula de modo positivo o acúmulo de (p)ppGpp na célula de XAC, visto que o mutante *rpoZ* acumulou menores quantidades de (p)ppGpp perante a resposta de carência a aminoácidos (Figura 109). O mutante $\Delta relA$ também acumulou menos (p)ppGpp que a cepa selvagem (Fig. 109). Adicionalmente, quase não se detectou a presença de (p)ppGpp na cepa carregando as deleções $\Delta rpoZ \Delta relA$. Estes resultados indicam que RelA é a principal enzima envolvida na síntese de (p)ppGpp em resposta a carência de aminoácidos em XAC. A pequena quantidade de (p)ppGpp acumulada no mutante *relA*, sugere que SpoT também pode contribuir para a síntese de (p)ppGpp durante o estresse por carência nutricional em XAC.

A Figura 109 também mostra que $\Delta rpfG$ acumulou menores quantidades de (p)ppGpp que a cepa selvagem, sugerindo que a via *do quorum-sensing* exerça um controle positivo sobre os fatores que atuam na resposta estrigente em XAC. Por exemplo, a via *rpf* pode ativar a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de (p)ppGpp, ou ainda, como $\Delta rpfG$ apresenta concentrações de c-diGMP aumentadas na célula, o c-diGMP pode inibir a expressão ou a atividade de RelA.

O baixo acúmulo de (p)ppGpp em $\Delta rpoZ$ transformado com pUFR047-*rpoZ*+*spoT* (Fig. 109) pode ter sido ocasionado pelo excesso da atividade de fosfohidrolase de SpoT_{HD}. Esta cepa possui pelo menos duas cópias de *spoT* (XAC3393), uma no seu cromossomo e outra na construção pUFR047-*rpoZ*+*spoT*. Infelizmente este ensaio não foi realizado com a cepa $\Delta rpoZ$ transformada com a construção pUFR047-*rpoZ*, que contém apenas o gene *rpoZ* clonado no vetor pUFR047.

Figura 109. Análise da produção de (p)ppGpp durante o estresse por carência de aminoácidos em XAC. Cepas de XAC foram crescidas por 16h em meio 2xTY foram centrifugadas, e as células lavadas com meio mínimo pH 7 (15 mM MOPS, 0.3% glicose 250 μ M Fosfato, aminoácidos, 10 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 1mM NH_4Cl , 5 mM FeSO_4) e diluídas para $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0.3 no mesmo meio mínimo suplementado com 200 μ M de P^{32} e antibióticos adequados. Em seguida, as células foram crescidas por 4 horas, alíquotas de 20 μ L de cada cultura foram coletadas e misturadas com 11 M ácido fórmico, e mantidas no gelo. A seguir para promover o estresse de carência de aminoácidos adicionou-se 1 mg/mL de serina hidroxamato em cada cultura. Após induzir o estresse por 25 minutos, alíquotas de 20 μ L de cada cultura foram coletadas, misturadas com ácido fórmico e mantidas no gelo. Um volume de 10 μ L de cada amostra foram aplicados e resolvidos na placa de CCD com o tampão 1.5 M K_2PO_4 pH 3,5. A placa de CCD foi seca e exposta ao filme fotográfico (Kodak). O filme sensibilizado foi revelado depois de 12 horas. (WT) cepa de XAC selvagem, (*rpoZ*-) $\Delta rpoZ$; (*rpoZ*+) $\Delta rpoZ$ transformada com a construção pUFR047-*rpoZ*+*spoT*; (*relA*), $\Delta relA$; (*rpoZ-relA*-), cepa carregando as deleções de *rpoZ* e *relA*; (*rpfG*-), $\Delta rpfG$.

4.5.8. A síntese de histidina é regulada positivamente por *rpoZ* em XAC

O *operon* que codifica enzimas envolvidas na biossíntese histidina é regulado de modo positivo pelo aumento da concentração de (p)ppGpp nas células de enterobactérias (Rudd *et al.*, 1985). Para verificar se *rpoZ* controla a biossíntese de histidina em XAC, inoculamos um mesmo número de células da cepa selvagem e mutantes em placas contendo o meio mínimo M9 1.5% ágar suplementado com concentrações crescentes de 3-amino triazol (3-AT) (Figura 110). O 3-AT é um inibidor competitivo do produto do gene *his3*, imidazolglycerol-fosfato

desidrogenase que catalisa o sexto passo na biossíntese de histidina na célula bacteriana. Neste ensaio, observamos uma redução do crescimento dos mutantes $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpoZ\Delta relA$ (Fig. 110). A complementação do mutante $rpoZ$ com a construção pUFR047- $rpoZ$ + $spoT$ restaurou o crescimento do mutante em presença do inibidor 3-AT (Fig. 110).

O acúmulo de (p)ppGpp parece não estar diretamente relacionado com o crescimento de XAC na presença do inibidor da via de biossíntese de histidina. De fato, as cepas que apresentaram um menor acúmulo de (p)ppGpp nos ensaios de CCD ($\Delta relA$, $\Delta rpfG$ e a complementação de $\Delta rpoZ$) também conseguiram crescer normalmente com o aumento da concentração de 3-AT no meio. Por outro lado, a presença de $rpoZ$ na célula parece ser essencial para XAC conseguir crescer em presença de 3-AT.

Figura 110. Controle positivo de $rpoZ$ sobre a biossíntese de histidina em XAC. As cepas de XAC foram crescidas no meio mínimo (MM) 1.5% ágar suplementado com diferentes concentrações de 3-amino triazol (0, 200mM, 300 mM e 400 mM). Wt, cepa selvagem; $rpfG$, $\Delta rpfG$; $rpoZ^-$, $\Delta rpoZ$; $relA^-$, $\Delta relA$; $rpoZ-relA^-$, mutante com as deleções de $rpoZ$ e $relA$; e $rpoZ^+$, $\Delta rpoZ$ transformada com pUFR047- $rpoZ$ + $spoT$.

4.5.9. A atividade de fosfohidrolase de XAC1185, um parálogo do domínio HD de SpoT, é inibida por $rpoZ$ em XAC

A análise do genoma de *Xanthomonas* nos permitiu identificar uma orf (XAC1185) que possui o domínio de fosfohidrolase conservado, homólogo ao domínio HD de SpoT. A Figura 111 apresenta uma análise comparativa entre XAC1185, o domínio SpoTHD₆₄₋₁₆₅ de XAC, e os homólogos de XAC1185 em outras bactérias. O alinhamento das sequências de aminoácidos dos homólogos de XAC1185 mostra que o motivo HDxxED envolvido na

Figura 111. Análise comparativa das sequências homólogas de XAC1185 com o domínio SpoT_{HD64-165} (XAC3393) usando ClustalW. O motivo conservados HDxxED está indicado por um traço acima dos resíduos. Homólogos de XAC1185 em outras bactérias: VCHO, *Vibrio cholerae*; RSOL, *Ralstonia solanacearum*; PAO1, *Pseudomonas aeruginosa*; XAC, *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*; XCC, *Xanthomonas campestris* pv *campestris*; STYPH, *Salmonella typhimurium*.

Figura 112. Purificação da proteína recombinante 6HisXAC1185 por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™-Amersham) carregada com níquel. M, Marcador de peso molecular (Sigma); E extrato solúvel de *E. coli* (BL21DE3) aplicado na coluna de afinidade.

Para investigar a atividade de XAC1185 *in vivo*, obtivemos a construção pBRA-XAC1185HD, onde a orf XAC1185 foi fusionada ao promotor BAD. Adicionalmente, produzimos por mutação sítio dirigida uma versão mutada de XAC1185, na qual o resíduo catalítico aspartato 58, do motivo H₅₇D₅₈xxE₆₁D₆₂, foi substituído por uma alanina, sendo esta construção denominada pBRA-XAC1185HD58A. As cepas selvagem e mutante $\Delta rpoZ$ foram transformadas com ambas as construções, crescidas em meio mínimo M9 e submetidas ao estresse por carência de aminoácidos com SHM. A análise dos extratos dessas células em CCD revelou que XAC1185 apresenta atividade de fosfohidrolase detectável somente no mutante $\Delta rpoZ$ transformado com pBRA-XAC1185HD, mas não com pBRA-XAC1185HD58A (Figura 113A). Interessantemente, estes resultados indicam que a presença de *rpoZ* na célula de XAC pode inibir a atividade de fosfohidrolase de XAC1185. O mesmo ensaio também foi realizado substituindo a L-arabinose do meio por D-glicose. Na ausência do indutor L-arabinose não se observou redução de (p)ppGpp no extrato celular do mutante $\Delta rpoZ$ transformado com pBRA-XAC1185HD (Figura 113B). Adicionalmente, a complementação de $\Delta rpoZ$ com a construção pUFR047-*rpoZ* resultou no acúmulo de (p)ppGpp similar a cepa de XAC selvagem (Fig. 113).

A) 0.3% L-arabinose **B) 0.3% D-glicose**

Figura 113. A super-expressão de XAC1185 reduz o acúmulo de (p)ppGpp somente em $\Delta rpoZ$ durante o estresse por carência de aminoácidos. **A)** Indução de pBRA-XAC1185 com L-arabinose. As cepas de XAC crescidas por 16h em meio 2xTY foram centrifugadas, e as células lavadas com meio mínimo pH 7 (15 mM MOPS, 0.3% glicose 250 μ M Fosfato, aminoácidos, 10 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 1mM NH_4Cl , 5 mM $FeSO_4$) e diluídas para DO_{600nm} 0.3 no mesmo meio mínimo suplementado com 0.3% L-arabinose 200 μ M de P^{32} e antibióticos adequados. As células foram crescidas por 4 horas, e alíquotas de 20 μ L de cada cultura foram coletadas e misturadas com 11 M ácido fórmico e mantidas no gelo. A seguir para promover o estresse de carência de aminoácidos adicionou-se 1 mg/mL de serina hidroxamato (SHM) em cada cultura. Após induzir o estresse por 25 minutos, alíquotas de 20 μ L de cada cultura foram coletadas, misturadas com ácido fórmico e mantidas no gelo. Para o ensaio de CCD, 10 μ L de cada amostra foram aplicados na placa de CCD. As amostras foram resolvidas no tampão 1.5M K_2PO_4 pH 3,5. A placa de CCD foi seca e exposta ao filme fotográfico (Kodak). O filme sensibilizado foi revelado após 12 horas. **B)** Neste ensaio realizaram-se os mesmos procedimentos descritos acima, contudo ao invés de 0.3% de L-arabinose adicionou-se 0.3% de D-glicose ao meio mínimo. (WT), cepa selvagem; (WT+pBRA-XAC1185HD) cepa selvagem transformada com a construção pBRA- XAC1185HD; (WT+pBRA-XAC1185HA) cepa selvagem transformada com pBRA-XAC1185HD58A; $\Delta rpoZ$, mutante *rpoZ*; ($\Delta rpoZ$ +XAC1185HD) $\Delta rpoZ$ transformada com pBRA-XAC1185HD; ($\Delta rpoZ$ +XAC1185HA) $\Delta rpoZ$ transformada com pBRA-XAC1185HD58A; e ($\Delta rpoZ$ +pUFR047-*rpoZ*) complementação de $\Delta rpoZ$ com a construção pUFR047-*rpoZ*.

Produzimos uma cepa de XAC carregando a deleção de XAC1185 por recombinação homóloga utilizando o vetor suicida pNPTS138. O mutante $\Delta XAC1185$ não mostrou nenhuma alteração dos fenótipos de mobilidade produção de enzimas extracelulares e patogenicidade nas condições testadas (Figuras 114A, B e C).

A)

B)

C)

10 dias após inoculação

Figura 114. Fenótipos observados para a deleção de XAC1185. **A)** Mobilidade em meio SB 0,5% ágar. **B)** Produção de enzimas extracelulares, endoglucanases proteases extracelulares. **C)** Patogenicidade das cepas de XAC na folha de laranja pêra. Wt, XAC selvagem; *rpoZ*, $\Delta rpoZ$; XAC1185, cepa carregando a deleção de XAC1185.

5. Discussão

5.1. Identificação de novos reguladores da mobilidade e virulência em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Em geral, os sinais externos que promovem a mobilidade bacteriana atuam na redução da concentração do segundo mensageiro c-diGMP por ativar as enzimas fosfodiesterases, denominadas HD-GYP e EAL (Pesavento *et al.*, 2008; Kim and McCarter, 2007; Lee *et al.*, 2010). A redução do c-diGMP intracelular regula de forma positiva a expressão de genes do flagelo e pilus tipo IV em várias espécies de bactérias (Fang and Gomelsky, 2010; Hickman and Harwood, 2008; Jonas *et al.*, 2009) e ainda abole a inibição funcional exercida por proteínas receptoras PilZ sobre o aparato flagelar em enterobactérias (Ryjenkov *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2010). Adicionalmente, a redução da concentração de c-diGMP na célula bacteriana parece ser importante também para ativar a expressão de genes de virulência como fímbrias adesivas, componentes do SST2, SST3 e efetores de virulência que atuam diretamente nas células do hospedeiro durante a infecção (Mikkelsen *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2006a; Yi *et al.*, 2010).

Além do c-diGMP, outro segundo mensageiro, o (p)ppGpp, conhecido como fator de resposta a resposta severa, que atua principalmente durante o estresse nutricional inibindo o crescimento bacteriano, exerce um papel importante na ativação da virulência em bactérias (Dalebroux *et al.*, 2010; Klinkenberg *et al.*, 2010). Recentes achados demonstram a co-regulação por c-diGMP e (p)ppGpp sobre a produção de exopolissacarídeos, fímbrias adesivas e formação de biofilme em *E. coli* (Aberg *et al.*, 2006; Boehm *et al.*, 2009).

No início deste projeto havia sido caracterizado para *Xanthomonas* apenas o sistema de sinalização do *quorum-sensing* RpfC-RpfG como regulador da concentração de c-diGMP na célula. O sistema de dois componentes RpfC-RpfG era até recentemente o único sistema ativador da mobilidade e produção de fatores de virulência caracterizado neste grupo de bactérias (Fouhy *et al.*, 2006). Deste modo, além de verificar a função do sistema Rpf em

XAC, propusemos neste projeto identificar e caracterizar novos reguladores do metabolismo de c-diGMP e (p)ppGpp e consequentemente dos processos de mobilidade e virulência em XAC. Para isso, foram produzidos 54 mutantes por recombinação homóloga em XAC. Vários genes deletados possuem homólogos envolvidos na regulação da mobilidade e virulência em outras espécies bacterianas. Também foram deletadas algumas orfs hipotéticas tidas como potenciais reguladores do processo de *quorum-sensing* em XAC. Os fenótipos dos mutantes gerados foram então estudados em diferentes ensaios para verificar a mobilidade em meio semi-sólido, produção de fatores de virulência e patogenicidade.

5.1.1. Mutantes com fenótipos de mobilidade alterados em meio semi-sólido

A mobilidade dos mutantes de XAC foi analisada nos meios semi-sólidos Eiken e SB. No meio Eiken 0.6% ágar, o qual foi usado por Ryan et al (2006, 2007) para demonstrar a mobilidade de XCC dependente de T4P, verificamos uma redução da mobilidade nos mutantes $\Delta rpfF$ -C-G de XAC. Adicionalmente, observamos uma redução da mobilidade dos mutantes $\Delta csrA$ (XAC1743), Δhfq (XAC1735), $\Delta rpoZ$ (XAC3394), $\Delta XAC2975$, $\Delta XAC3402PilZ$, $\Delta XAC1040$ (*ppk*) e $\Delta gumD$. Em contrapartida, observamos um aumento da mobilidade nos mutantes com deleções nos genes que codificam proteínas com os domínios GGDEF+EAL como XAC2398 (*fimX*), XAC2382_{GGDEF-EAL} e XAC0495_{GGDEF-EAL}, proteínas quinases XAC3098 (*pilL*) e XAC3683, PilB (XAC3239) e flagelina XAC1975 (*fliC*).

O ensaio no meio SB mostrou uma redução da mobilidade para os mutantes $\Delta rpfF$ -C-G, Δclp , $\Delta csrA$, Δhfq , $\Delta rpoZ$ e também conferiu um aumento do comportamento móvel para os mutantes $\Delta XAC3098$ (*pilL*), carregando a deleção de genes codificadores das proteínas com domínio GGDEF+EAL ($\Delta XAC2382$, $\Delta XAC0495$ e $\Delta XAC2398$). Contudo as deleções dos genes *fliC*, *XAC1040*, *XAC3683* e *XAC3402PilZ* não mostraram alteração de mobilidade neste meio. Por outro lado, observamos apenas no meio SB o aumento da mobilidade de $\Delta pilT$

(XAC2924) e a redução da mobilidade dos nocautes $\Delta XAC0208$ (um homólogo de NtrC) e $\Delta XAC4103$ (cujo homólogo em XCC esta envolvido na síntese de um fator difusível (DF) – uma segunda molécula sinalizadora de *Xanthomonas* que ativa a produção do pigmento xantomonadina e goma xantana (Poplawsky *et al.*, 2005). Recentemente a identidade de DF foi determinada por ressonância magnética nuclear como sendo o ácido 3-hidroxibenzóico (He *et al.*, 2011).

Observamos que a mobilidade de XAC nas condições testadas, diferentemente de XCC, é realmente inibida pelo PT4 no meio SB e por PT4 e flagelo em Eiken, sendo dependente da produção de goma xantana em ambos os meios. O aumento acentuado da mobilidade dos mutantes $\Delta pilB$, $\Delta pilT$ e $\Delta pilL$ no meio SB é similar ao observado para a deleção do gene *XAC1815* que codifica uma fímbria adesiva homóloga a hemaglutinina FhaB (Gottig *et al.*, 2009).

Os genes *XAC0495*_{GGDEF-EAL} e *XAC2382*_{GGDEF-EAL}, cujas deleções mostraram aumento da mobilidade podem atuar de modo similar a *XAC2398*_{GGDEF-EAL} regulando a biogênese do PT4 (Guzzo *et al.*, 2009) ou de maneira diferente ativando a expressão de fímbrias adesivas.

Adicionalmente, os mutantes $\Delta rpfFCG$, $\Delta csrA$, $\Delta rpoZ$, Δhfq , $\Delta XAC0208$, $\Delta XAC2975$ e $\Delta XAC4103$, que apresentaram redução da mobilidade no meio SB, podem atuar na regulação positiva da síntese de goma xantana e/ou regular negativamente a biogênese do PT4 e fímbrias adesivas em XAC.

Tanto a complementação quanto a super-expressão de *rpfG* nos mutantes Δhfq e $\Delta XAC2975$ restauraram a mobilidade no meio SB. Em conjunto estes resultados sugerem que Hfq em complexo com RNAs não-codificadores pode estabilizar RNA mensageiros específicos (Bhatt *et al.*, 2011). Onde o complexo Hfq-RNanc pode funcionar como um regulador positivo da tradução de genes envolvidos na síntese de goma xantana ou também

um repressor da expressão de componentes do PT4, ativando a mobilidade de XAC. Da mesma forma, XAC2975, que codifica uma proteína HPr quinase/fosforilase envolvida no transporte de açúcares para dentro da célula (Deutscher *et al.*, 2005), pode exercer um controle positivo no transporte de monossacarídeos e dissacarídeos, os quais aumentam a biossíntese da goma xantana. De fato, a ausência de sacarose no meio e o aumento da concentração de ágar fazem com que as células de XAC percam o fenótipo de mobilidade observado no meio SB 0.6% ágar. A supressão do fenótipo dos mutantes Δhfq e $\Delta XAC2975$, com a super-expressão de *rpfG*, sugere também que os produtos destes genes podem atuar regulando a concentração de c-diGMP dentro das células de XAC.

O mutante $\Delta XAC0208_{NtrC}$ (um ativador do sigma 54) mostrou redução da mobilidade no meio SB. Nosso grupo mostrou que XAC0208 interage com o RpfG e NtrB (XAC0207), uma proteína quinase envolvida no metabolismo de nitrogênio (Andrade *et al.*, 2006). Em condições com limitações de nitrogênio o sistema de dois componentes formado por NtrB-NtrC ativa a expressão de *glnA* (XAC0204), que codifica a enzima glutamina sintetase em bactérias (Krajewska-Grynkiewicz and Kustu, 1984; Schwab *et al.*, 2007). Contudo nossos achados indicam que os homólogos de NtrB-NtrC em XAC podem desempenhar outras funções, além de regular a expressão de *glnA*, como por exemplo, ativar a expressão de genes do *operon gum* no meio SB.

Os fenótipos dos mutantes $\Delta rpfF$ -C-G, $\Delta 1971_{PilZ}$, $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$ serão discutidos nas seções 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente.

5.1.2. Alteração da produção de fatores de virulência: Endoglucanases

As endoglucanases são importantes para a virulência de *Xanthomonas* por atuar na degradação da parede celular do hospedeiro, facilitando a introdução de outros fatores de virulência dentro da célula vegetal através do SST3. Por isso, as endoglucanases são

essenciais para subjugar os mecanismos de defesa do hospedeiro e promover a progressão da doença (Jha *et al.*, 2007; Buttner and Bonas, 2009).

A produção de endoglucanases em XCC aumenta em resposta ao processo de *quorum-sensing* (Slater *et al.*, 2000a; Fouhy *et al.*, 2006). A atividade de fosfodiesterase do domínio HD-GYP de RpfG regula positivamente a proteína Clp, que ativa diretamente a transcrição dos genes codificadores de endoglucanases em XCC (He *et al.*, 2007). O modo pelo qual Clp identifica a diminuição de c-diGMP na célula de *Xanthomonas* foi descrito recentemente com a descoberta que Clp ligado a molécula de c-diGMP sofre mudanças estruturais, o que impede a sua ligação a vários promotores de XCC (Tao *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2010).

Determinamos a atividade de endoglucanases nos sobrenadantes de culturas dos mutantes de XAC e mostramos uma redução da produção dessas enzimas em $\Delta rpfF$, $\Delta rpfC$, $\Delta rpfG$, Δclp e $\Delta csrA$, assim como observado para os nocautes dos seus homólogos em XCC (Ryan *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2008). Nestes ensaios também identificamos novos reguladores da produção de endoglucanases em XAC: *hfq*, XAC3683, XAC2975, XAC0258, *rpoZ* e XAC1883.

A atuação destes novos reguladores sobre a produção de endoglucanases em XAC ainda não é conhecida. No entanto, é possível levantar as seguintes hipóteses: 1) A regulação pós-transcricional do complexo Hfq-RNanc estabiliza RNA mensageiros codificadores de endoglucanases, componentes do SST2 ou um fator transcricional ativador da expressão de endoglucanases em XAC. Alguns RNancs foram descritos para *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* contudo ainda não foi demonstrado a interação direta do complexo Hfq-RNanc com RNA mensageiros de XOO (Liang *et al.*, 2011). 2) As proteínas quinases XAC3683 e XAC2975 podem ativar, através da fosforilação, reguladores de resposta (RR) que atuam como fatores de transcrição e levam ao aumento da expressão dos genes das endoglucanases em XAC. Por exemplo, XAC3683 interagiu com HrpG, um RR fusionado a um domínio de

ligação a DNA que regula positivamente a expressão de componentes do SST3 e SST2 em XAC (Alegria *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2011). 3) Finalmente XAC1883, cuja orf se encontra dentro do cluster *rpf*, possui um domínio de ligação a DNA e pode ligar-se a sítios promotores e ativar a expressão de genes envolvidos com a produção de endoglucanases em XAC.

5.1.3. Alteração da produção dos fatores de virulência: Proteases extracelulares

A análise da produção de proteases extracelulares nos mutantes de XAC confirmou, assim como em XCC, o controle positivo dos genes *rpfFCG* e *clp* sobre a produção destes fatores de virulência em XAC. Também foram identificados novos reguladores da produção de proteases extracelulares em XAC: *hfq*, XAC3683 e *rpoZ*. A deleção de *csrA* não alterou a produção de proteases extracelulares em XAC, assim como também observado para XCC e XOO (Zhu *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2008).

Como mencionando na seção 5.1.2, a proteína histidina quinase XAC3683 interage com o regulador de resposta HrpG (Alegria *et al.*, 2004), o qual ativa a transcrição de componentes dos SST2 e SST3 em XAC (Guo *et al.*, 2011). Se a atividade de HrpG é regulada por XAC3683, isto explica porque a deleção de XAC3683 reduz a produção tanto de endoglucanases como de proteases extracelulares em XAC .

5.1.4. Alteração da patogenicidade

Os mutantes produzidos foram inoculados em folhas de laranja-pêra (*Citrus sinensis*) e o desenvolvimento do cancro cítrico foi monitorado até 12 dias após as inoculações. Neste ensaio identificamos alteração da patogenicidade dos mutantes $\Delta rpfG$, Δclp , $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$. Outros trabalhos publicados já relataram a importância de *rpfG*, *clp* e *csrA* na regulação positiva da virulência em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Chao *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011). A descoberta que *rpoZ* também contribui para a

virulência em XAC é um resultado inédito e pode indicar que *rpoZ* está envolvido na ativação de genes de virulência em *Xanthomonas*.

Os sintomas característicos dos estágios de desenvolvimento do cancro cítrico, que são o encharcamento do tecido infectado, hiperplasia tecidual, hipertrofia celular e conseqüente necrose do tecido e dispersão do patógeno, foram bastante comprometidos nos mutantes $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$. No entanto, os mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp , apesar de apresentarem a sobrevivência reduzida dentro do hospedeiro, desenvolveram os sintomas do cancro em laranja-pêra.

Os outros mutantes inoculados mostraram uma patogenicidade igual à cepa selvagem. Isto sugere que os genes deletados podem estar envolvidos com os estágios iniciais da doença, os quais não foram analisados neste ensaio (por exemplo a entrada da bactéria através dos estômatos do hospedeiro).

A complementação e caracterização das curvas de crescimento dos mutantes $\Delta rpfG$, Δclp , $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$ no hospedeiro serão discutidas nas seções seguintes.

5.2. Fatores envolvidos na comunicação celular que regulam a concentração de c-diGMP, a mobilidade e a virulência em XAC

5.2.1. Interação do domínio HD-GYP de RpfG com proteínas GGDEF: Uma nova função regulatória para HD-GYP independente da sua atividade de fosfodiesterase

O domínio HD-GYP pertence à superfamília HD de proteínas que promovem a hidrólise de ligações fosfoéster na célula, sendo denominadas fosfohidrolases dependentes de metal, geralmente Mg^{2+} ou Mn^{2+} . O domínio HD pode estar fusionado a outros domínios como o de interação a RNA (KH), nucleotidiltransferase (NT), helicase tipo II (SFII-Hel), regulador de resposta (RR) e o novo domínio de sinalização ativado durante a carência nutricional denominado TGS. Este último está presente na proteína SpoT que regula a concentração de (p)ppGpp na célula bacteriana (Aravind and Koonin, 1998).

Os ensaios de dois híbridos mostraram que o motivo GYP do domínio HD-GYP é essencial para sua interação com algumas proteínas GGDEF de XAC. Contudo as mutações nos resíduos HD, que são importantes para desempenhar a função de fosfodiesterase (Ryan *et al.*, 2006b), não alteraram a capacidade de interação entre HD-GYP e as proteínas diguanilato ciclases.

No trabalho Ryan *et al.* (2010) demonstramos que a interação do domínio HD-GYP com proteínas GGDEF é regulada positivamente na célula de XCC pelo sinal de *quorum-sensing* DSF. Os complexos formados *in vivo* por RpfG_{HD-GYP} e as proteínas homólogas de XAC0258_{GGDEF} e XAC0424_{GGDEF} são essenciais para ativar a mobilidade dependente de pilus tipo IV em XCC. No entanto, mutações nos resíduos GYP, diferentemente de HD, não alteraram a produção endoglucanases e proteases em XCC. Utilizando como molde a estrutura de uma fosfohidrolase HD-dependente de metal (código PDB 2ogiB), a qual possui uma identidade de 18,7% com o domínio RpfG-HDGYP₂₀₀₋₃₂₀, construímos um modelo tridimensional hipotético para RpfG-HDGYP₂₀₀₋₃₂₀ com o programa SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org>). O modelo gerado revelou que os motivos HD e GYP apresentam-se distantes na estrutura tridimensional, o que corrobora para a independência funcional destes motivos em RpfG-HDGYP₂₀₀₋₃₂₀ (Figura 115).

Figura 115. Modelo tridimensional hipotético do domínio RpfG-HDGYP₂₀₀₋₃₂₀. O motivo HD destaca-se em vermelho e o motivo GYP é representado em verde. O modelo foi gerado com o programa Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>) baseando-se na estrutura 20giB (PDB) de uma fosfodiesterase HD-dependente de metal de *Streptococcus agalactiae* que possui uma identidade de 18,5% dos resíduos com RpfG-HDGYP₂₀₀₋₃₂₀.

A sinalização durante o processo de *quorum-sensing* em *Xanthomonas* é composta por vários níveis regulatórios onde os fatores atuantes são (Ryan *et al.*, 2010b; Andrade *et al.*, 2006; Chin *et al.*, 2010): A molécula sinal (DSF), a proteína quinase (RpfC), o regulador de resposta com atividade de fosfodiesterase (RpfG), o segundo mensageiro (c-diGMP) e o fator de transcrição Clp. Durante o *quorum-sensing* a diminuição da concentração de c-diGMP na célula promove a liberação de Clp, que pode se ligar a sítios de diferentes promotores ativando a expressão de fatores de virulência. Nosso grupo adicionou neste modelo uma rede de interações entre o domínio RpfG_{HD-GYP} e seus vários alvos celulares, as proteínas diguanilato ciclases (GGDEF). Esta teia de interações regula a mobilidade de *Xanthomonas* de modo ainda desconhecido. A complexidade deste sistema torna-se maior quando constatamos que os domínios GGDEF estão fusionados a outros diferentes domínios, os quais podem estar no citoplasma ou ancorados na membrana plasmática. Portanto, os diferentes sinais intra e extracelulares são captados por domínios sensores e controlam a atividade das proteínas GGDEF que podem regular o comportamento de *Xanthomonas* (Figura 116).

Figura 116. Sinalização do *quorum-sensing* em XCC adaptado de Ryan and Dow (2011). O sinal do *quorum-sensing* promove a fosforilação do domínio REC (regulador de resposta) de RpfG por RpfC. RpfG fosforilada atua através do seu motivo HD reduzindo a concentração de c-diGMP na célula de XCC e de forma dependente do seu motivo GYP também interage com diguanilato ciclases (GGDEF). A diminuição de c-diGMP libera Clp, que pode se ligar a promotores específicos ativando a expressão de fatores de virulência. Já a interação do motivo GYP com os domínios GGDEF regula positivamente a mobilidade em XCC de modo ainda desconhecido. Finalmente o c-diGMP pode controlar a formação de biofilme através de alvos ainda não caracterizados em *Xanthomonas*, adaptado. M, membrana citoplasmática; P, grupo fosforil (Ryan and Dow, 2011).

5.2.2. Mutantes $\Delta rpfFCG$ apresentam fenótipos de rugosidade da colônia e agregação celular

A deleção dos genes *rpfF*, *rpfC* e *rpfG*, que codificam os fatores envolvidos na comunicação celular em *Xanthomonas*, ocasionou o aparecimento de colônias rugosas em XAC e aumentou a formação de agregados celulares no meio L. A formação de agregados celulares também foi descrita para mutantes $\Delta rpfFCG$ em XCC, confirmando a atuação do sistema de comunicação celular de *Xanthomonas* na ativação do fenótipo de dispersão celular (Dow *et al.*, 2003). O sistema *rpf* em XCC além de ativar a expressão dos aparatos de mobilidade (flagelo e PT4) e reprimir a expressão de fímbrias adesivas, também ativa a

expressão e secreção de enzimas que hidrolisam a matriz de exopolissacarídeos que envolve as células de *Xanthomonas*. Uma enzima denominada de “enzima da dispersão” já foi caracterizada como endo-beta-1,4-mananase (Dow *et al.*, 2003; He *et al.*, 2007). Entretanto, experimentos demonstraram que somente a secreção da endo-beta-1,4-mananase não é suficiente para promover a hidrólise completa da goma xantana, ou seja, outras enzimas, que ainda não foram identificadas, parecem ser necessárias no processo de dispersão em *Xanthomonas* (Dow *et al.*, 2003).

A super expressão da diguanilato ciclase XAC0424 na cepa de XAC selvagem, promoveu o aparecimento dos fenótipos de rugosidade nas colônias e agregação celular no meio 2xTY suplementado com L-arabinose 0.3%, similares aos fenótipos descritos para mutantes $\Delta rpfFCG$ de XAC. Adicionalmente, confirmamos que a proteína 6HisXAC0424 é capaz de produzir c-diGMP *in vitro*, tendo portanto o seu domínio GGDEF ativo. Ensaio de dois híbridos com XAC0424 mostraram que ela pode interagir com ela mesma a partir dos resíduos iniciais da sua extremidade amina, indicando que esta interação homotrópica é importante para síntese de c-diGMP. A interação a partir da extremidade amina pode aproximar os domínios GGDEF na extremidade carboxílica de XAC0424, os quais devem ser ativos na forma de dímeros como ocorre com PleD em *Caulobacter* (Paul *et al.*, 2007). A região amino-terminal de XAC0424 não possui alta homologia com nenhum domínio descrito na literatura, embora tenhamos identificado alguns resíduos que podem formar uma estrutura tipo *coiled-coil* e deste modo, aproximar os seus domínios GGDEF.

Os resultados observados, aparecimento da rugosidade de colônia e aumento da agregação celular, nos mutantes $\Delta rpfFCG$ e com a super-expressão da proteína GGDEF XAC0424 em XAC, levantaram a hipótese que estes fenótipos estariam sendo ativados pelo aumento de c-diGMP nas células. Em ambos os casos, mutantes que perderam a atividade da

fosfodiesterase RpfG e a super expressão da diguanilato ciclase XAC0424, pode-se ocasionar um aumento global da concentração de c-diGMP nas células de XAC.

5.2.3. A mobilidade de XAC em meio SB semi-sólido é regulada por uma rede complexa de sinais envolvendo o sistema Rpf, Clp, diguanilato ciclasas e fosfodiesterases

Os ensaios de mobilidade em meio SB 0.6% ágar dos mutantes $\Delta rpfFCG$ e Δclp , confirmaram a atuação positiva da via do *quorum-sensing* na regulação da mobilidade de XAC, semelhante como ocorre com os nocautes dos homólogos destes genes em XCC (Ryan *et al.*, 2006a; He *et al.*, 2007). A complementação dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp restaurou a mobilidade destes nocautes, confirmando a atuação positiva destes fatores na regulação da mobilidade de XAC. Adicionalmente, o fenótipo do mutante $\Delta rpfG$ foi restaurado com as construções contendo apenas seu domínio HD-GYP e XAC1887. Nos dois casos, a restauração do fenótipo do nocaute de *rpfG* ocorreu com a expressão em trans de fosfodiesterases, indicando que a redução da sua mobilidade pode ser resultado do aumento global da concentração de c-diGMP na célula de XAC.

O estudo da mobilidade dos mutantes que carregam deleções dos genes codificadores das proteínas GGDEF, as quais interagem com RpfG, mostraram uma pequena redução da mobilidade para os mutantes $\Delta XAC0258$, $\Delta XAC0424$, $\Delta XAC1486$, $\Delta XAC1939$ e $\Delta XAC1940$, enquanto os nocautes $\Delta XAC1420$ e $\Delta XAC0593$ apresentaram uma modesta dispersão das células da colônia. Estes resultados podem ser explicados pela sobreposição de funções regulatórias destas proteínas GGDEF sobre fatores que controlam a mobilidade de XAC. De fato, a deleção de dois genes codificadores de proteínas com domínio GGDEF na mesma célula resultou em alterações mais acentuadas da mobilidade de XAC. Demonstramos isto para as cepas $\Delta XAC0258\Delta XAC1940$ e $\Delta XAC0258\Delta XAC1420$, as quais mostraram um aumento e redução da mobilidade, respectivamente. Entretanto, a cepa $\Delta XAC0258\Delta XAC0424$

não mostrou alteração na mobilidade, embora a deleção dos seus homólogos numa mesma célula em XCC tenha resultado no aumento da mobilidade (Ryan *et al.*, 2010b).

Diferente das deleções dos outros genes que codificam proteínas GGDEF que interagem com RpfG, a deleção de XAC2382 ocasionou um aumento significativo da mobilidade de XAC. O gene XAC2382 codifica uma proteína de membrana com os domínios GGDEF e EAL. A análise das estruturas primárias de ambos os domínios indica que XAC2382 pode funcionar tanto como diguanilato ciclase quanto como fosfodiesterase. Contudo, seus domínios GGDEF e EAL devem estar sobre a regulação de sinais que chegam ao seu domínio de membrana, evitando a ocorrência de um ciclo fútil com produção e hidrólise de c-diGMP. A deleção de XAC2382 aumentou significativamente a mobilidade de XAC e a expressão em trans de apenas seu domínio 2382_{EAL} foi capaz de reverter o fenótipo, reduzindo a mobilidade no meio SB. Estes resultados indicam que, diferentemente da expressão das outras fosfodiesterases (RpfG e XAC1887), as quais aumentaram a mobilidade de XAC, o domínio XAC2382_{EAL} promoveu a sua redução, sugerindo outra forma de regulação como interação proteína-proteína na via de sinalização regulada por XAC2382_{GGDEF+EAL}. Encontrar parceiros de interação do domínio XAC2382_{EAL} pode mostrar como a sinalização é transduzida, passando por XAC2382 e chegando até o aparato de mobilidade de XAC. Num modelo hipotético, pode-se imaginar a interação do domínio XAC2382_{EAL} com um domínio PilZ, receptor de c-diGMP. Esta interação não foi demonstrada ainda, mas o complexo XAC2382_{EAL}-PilZ poderia regular a expressão de componentes do PT4, adesinas ou goma xantana. Esta hipótese está embasada no fato que domínios EAL podem interagir com domínios PilZ, como mostrado para XAC1938_{EAL}-XAC3402_{PilZ} (seção 4.3) e XAC2398_{EAL}-XAC1133_{PilZ} (Guzzo *et al.*, 2009).

A super-expressão em XAC dos genes codificadores de diguanilato ciclases (XAC0258 e XAC0424) e fosfodiesterase (XAC1887) apresentou um resultado contrário.

Enquanto XAC0258_{GGDEF} e XAC0424_{GGDEF} reduziram a mobilidade de XAC, a super-expressão induzida da fosfodiesterase XAC1887 aumentou sua capacidade de dispersão pela superfície semi-sólida.

Os nocautes de genes codificadores do PT4, $\Delta pilT$ - $\Delta pilB$ - $\Delta pilL$, do flagelo $\Delta fliC$ e da via de biossíntese da goma xantana $\Delta gumD$, serviram como controles no estudo da mobilidade dos mutantes de XAC. A deleção de *fliC* não resultou em alteração da mobilidade de XAC no meio SB 0,5% ágar. Um aumento significativo da mobilidade foi verificado em todos os nocautes dos genes codificadores do PT4, mostrando um controle negativo do pilus sobre a mobilidade de XAC neste meio. A deleção de *fliC* e *pilT* na mesma cepa de XAC resultou no aumento da mobilidade igual ao observado para a deleção de apenas *pilT*. Por outro lado, o nocaute de *gumD* reduziu a mobilidade, indicando que a goma é um fator importante para a dispersão de XAC sobre a superfície semi-sólida.

Análises por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a presença apenas de flagelo nas superfícies celulares dos mutantes que apresentaram aumento da mobilidade ($\Delta XAC2382$, $\Delta pilL$ e $\Delta XAC0258\Delta I940$), podendo o PT4 estar ausente nestes mutantes. As cepas selvagem e super-expressando *rpfG* apresentaram flagelo e pilus, enquanto o mutante $\Delta rpfG$ mostrou apenas flagelo. Em resumo, estes resultados são consistentes com a hipótese que a mobilidade observada em XAC é reduzida quando o PT4 está presente na superfície da célula.

Ensaio para identificar diferenças entre a mobilidade de XAC e de XCC foram realizados nos meios Eiken e SB 0,5% ágar. O nocaute de *pilB* em XCC apresentou redução da sua mobilidade somente no meio Eiken. Confirmando a mobilidade dependente de PT4 descrita previamente para o mutante $\Delta pilA$ de XCC (Ryan *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2006a). Entretanto, a deleção de *pilB* em XAC aumentou a sua mobilidade nos meios Eiken e SB 0,5% ágar. Adicionalmente, a deleção de *gumD* e *pilB* numa mesma célula de XAC aboliu o

aumento de mobilidade do mutante $\Delta pilB$. Portanto, a mobilidade desenvolvida por XAC e XCC nos meios Eiken e SB é dependente da atuação de diferentes fatores na superfície da célula bacteriana, sendo a produção da goma xantana essencial para aumentar a mobilidade do mutante $\Delta pilB$ de XAC.

O modo de infecção de XAC é outro fator importante para ser considerado nos estudos de mobilidade. Diferentemente de XCC, as células de XAC apresentam uma infecção local (sem movimentação pelo tecido do hospedeiro), embora a mobilidade de XAC possa ser essencial na entrada do patógeno através dos estômatos até o parênquima foliar. A identificação dos sinais que ativam a mobilidade de XAC dependente dos aparatos PT4 e flagelo pode ajudar a responder em qual estágio da infecção a bactéria apresenta um comportamento móvel.

5.2.4. O papel da goma xantana na mobilidade dos mutantes no meio SB

Nossos resultados sobre a mobilidade de XAC no meio SB revelaram que a produção de goma xantana é essencial para ocasionar a dispersão das células da colônia. Adicionalmente, alguns mutantes como $\Delta pilT$ e $\Delta pilB$ apresentaram um aumento da mobilidade e a deleção dos genes *pilB* e *gumD* na mesma célula aboliu o aumento significativo da mobilidade adquirida com a deleção de *pilB*. Gottig *et al.* (2009) mostraram que a deleção do gene homólogo a *fhaB* em XAC, que codifica uma adesina, promoveu um aumento da dispersão celular no meio SB e aumentou a produção de goma xantana neste mutante .

Seguindo este raciocínio, realizamos a quantificação da goma xantana nos mutantes que tiveram a mobilidade alterada e confirmamos um aumento de aproximadamente 26% da produção de goma xantana no mutante $\Delta pilT$. Por outro lado, observamos uma menor quantidade de goma xantana nos sobrenadantes dos nocautes *rpfG* e *gumD*. Para verificar se a maior produção de goma xantana em $\Delta pilT$ foi promovida pelo aumento da expressão do

operon gum, produzimos uma construção contendo a fusão transcricional do promotor *gum* com o gene repórter *gus*. Utilizando esta construção verificamos um aumento da atividade da atividade da β -glucuronidase no mutante $\Delta pilT$. Portanto, assim com demonstrado para a cepa com a deleção de *fhaB*, o mutante $\Delta pilT$ apresenta uma expressão aumentada de cerca de 2.5 vezes do operon *gum* (Gottig *et al.*, 2009).

Os mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp apresentaram uma redução de aproximadamente 40% da produção de goma e também uma menor expressão do promotor *gum*, corroborando com os dados obtidos para a deleção dos seus homólogos em XCC (Ryan *et al.*, 2006a; Ryan *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007). Deste modo, podemos afirmar que a via Rpf exerce um controle positivo sobre a mobilidade e produção de goma xantana em XAC.

Estes resultados levantam o seguinte questionamento: Como a deleção de genes que codificam componentes do PT4 promove um aumento da expressão do *operon gum* e ativa uma maior dispersão das células de XAC? Podemos propor que a não funcionalidade do PT4 reduz a adesão entre as células de XAC e a superfície e também entre as próprias células. Deste modo, as células com menor aderência podem se dispersar mais facilmente pelo meio SB. Adicionalmente, a ausência de componentes do PT4 pode impedir a formação de complexos protéicos dentro da célula que regem os sinais intra e extracelulares, regulando por meio de interações proteína-proteína não somente a mobilidade mas também a produção de goma. A formação do complexo regulatório FimX-PilZ-PilB descrito em XAC é um exemplo para este tipo de regulação, onde a localização celular de determinada proteína pode controlar sua atividade (Guzzo *et al.*, 2009). A descoberta do fator que ativa diretamente a expressão do *operon gum* nas cepas $\Delta pilT$ e $\Delta pilB$ pode nos mostrar qual é o sinal promotor do aumento da produção de goma xantana e consequentemente da mobilidade de XAC.

5.2.5. A via de sinalização Rpf é essencial para produção de endoglucanases e proteases extracelulares em XAC

A análise da produção dos fatores de virulência nos mutantes $\Delta rpfFCG$ e Δclp mostrou que a via de *quorum-sensing* ativa a produção de endoglucanases e proteases extracelulares em XAC. A perda da sinalização do sistema Rpf quase aboliu a atividade de endoglucanases e proteases no sobrenadante destes mutantes. A complementação dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp restaurou a produção de endoglucanases e proteases extracelulares. A expressão em trans de *clp* na complementação de Δclp promoveu um aumento significativo da atividade destes fatores de virulência no sobrenadante de XAC. Isso indica que a regulação da expressão dos genes que codificam as endoglucanases e proteases extracelulares é realizada diretamente por Clp de maneira dependente da sua concentração na célula.

O mutante $\Delta rpfG$ também teve seu fenótipo revertido parcialmente com a expressão em trans do seu domínio HD-GYP e completamente com a super-expressão de outra fosfodiesterase XAC1887. De modo interessante a super expressão de XAC1887 na cepa Δclp não reverteu seu fenótipo. Estes resultados confirmam que o sinal transduzido pela via Rpf para dentro da célula de XAC promove a ativação de Clp, permitindo sua ligação nos promotores dos genes que codificam endoglucanases e proteases extracelulares e elevando a produção desses fatores de virulência pelas células.

A reversão parcial do fenótipo do mutante $\Delta rpfG$ por seu domínio HD-GYP também ocorre em XCC (Ryan *et al.*, 2006a), sugerindo que a atividade de fosfodiesterase deste domínio é maior quando o mesmo encontra-se fusionado ao domínio regulador de resposta na RpfG inteira. A estrutura de RpfG ainda não foi resolvida, mas os resultados indicam que interações entre os seus domínios regulador de resposta (RR) e HD-GYP regulam a sua atividade de fosfodiesterase (Ryan *et al.*, 2010b). De fato, RpfG encontra-se ativa quando é fosforilada pela proteína quinase RpfC (Ryan *et al.*, 2010b; Ryan and Dow, 2011). A fosforilação de RpfG a direciona para interagir com proteínas GGDEF na célula de

Xanthomonas (Ryan *et al.*, 2010b), portanto, a modificação pós-traducional seguida da localização de RpfG coordenam a funcionalidade de RpfG.

Adicionalmente a deleção dos genes codificadores de proteínas GGDEF, que interagem com RpfG, revelou que XAC0258 também regula positivamente a produção de endoglucanases. O nocaute de XAC0258 reduziu de aproximadamente 40% a atividade de endoglucanases no sobrenadante de XAC. A proteína homóloga a XAC0258 em XCC interage com RpfG *in vivo* após a ativação da via Rpf por DSF (Ryan *et al.*, 2010b). No entanto, não é conhecido o sinal que regula a atividade dos homólogos de XAC0258 em *Xanthomonas* e seu controle positivo na mobilidade e síntese dos fatores de virulência ainda não pode ser explicado.

Outra observação importante foi que além da super expressão da diguanilato ciclase XAC0424 comprometer a mobilidade de XAC, também promoveu uma menor produção de endoglucanases e proteases extracelulares. Estes fenótipos são similares aos apresentados pelo mutante $\Delta rpfG$, sugerindo que a redução da produção dos fatores de virulência seja ocasionada pelo aumento da concentração de c-diGMP na célula de XAC.

5.2.6. A deleção de *rpfG* promove um aumento da concentração de c-diGMP nas células de XAC

O segundo mensageiro c-diGMP regula uma variedade de processos celulares em bactérias incluindo resistência a antibióticos, formação de biofilme produção de exopolissacarídeos, síntese de adesinas, mobilidade e ciclo celular (Hoffman *et al.*, 2005; Christen *et al.*, 2010). Um grande número de proteínas diguanilato ciclases (GGDEF) e fosfodiesterases (EAL e HD-GYP) sintetiza e hidrolisa, respectivamente, o c-diGMP. Apesar de o genoma bacteriano codificar múltiplas proteínas GGDEF e EAL, a regulação da atividade destes domínios é realizada geralmente por um segundo domínio que se encontra fusionado ao domínio catalítico. Desta forma o metabolismo do c-diGMP é regulado por

sinais externos que atingem a célula bacteriana e ativa um determinado domínio sensor das proteínas GGDEF e/ou EAL/HD-GYP.

A função biológica do c-diGMP é desempenhada por seus diversos receptores que incluem proteínas com domínio PilZ, GGDEF e EAL inativos, fatores de transcrição e “riboswitches”. O controle de c-diGMP sobre o ciclo celular e suas múltiplas funções na célula bacteriana, somado a presença de inúmeros parálogos de proteínas diguanilato ciclases, fosfodiesterases e PilZ indicam uma regulação espacial e temporal onde a concentração de c-diGMP apresenta uma distribuição assimétrica na célula bacteriana (Christen *et al.*, 2010). Seguindo este raciocínio, pode-se esperar que a super-expressão de diguanilato ciclases ou fosfodiesterases abole esta distribuição assimétrica de c-diGMP na célula. Assim, o aumento ou diminuição global de c-diGMP pode revelar fenótipos que na verdade são regulados estritamente por uma determinada diguanilato ciclase ou fosfodiesterase ou por um subconjunto destes parálogos (Solano *et al.*, 2009; Christen *et al.*, 2010).

Os mutantes $\Delta rpfFCG$ de XAC mostraram fenótipos de agregação celular, rugosidade de colônia, redução da mobilidade e comprometimento na produção de exopolissacarídeos e fatores de virulência. De mesmo modo, detectamos esses mesmos fenótipos com a super expressão da proteína XAC0424_{GGDEF}. A atividade de diguanilato ciclase de XAC0424_{GGDEF} recombinante foi demonstrada *in vitro*. Esses resultados sugeriram que a deleção de *rpfFCG* assim como a super expressão de XAC0424 promoveram um aumento da concentração de c-diGMP na célula de XAC.

A quantificação com base na curva padrão para c-diGMP e o cálculo das taxas de perda adicionando cAMP na extração permitiram concluir que a deleção de *rpfG* aumentou em 4,5 vezes a concentração de c-diGMP nas células de XAC. A proteína RpfG interage com um subconjunto de proteínas GGDEF podendo regular a produção de c-diGMP local por essas diferentes sintetases na célula. Esta observação explica pelo menos em parte o fato de a

deleção de *rpfG* promover o aumento global de c-diGMP nas células XAC, diferente do que ocorreu com os nocautes de outras fosfodiesterases, como por exemplo XAC2868 e XAC1887.

5.2.7. A via de sinalização Rpf aumenta a afinidade de Clp pelo promotor do operon *xcs* de XAC

Vários sítios de ligação para o fator de transcrição Clp foram caracterizados em XCC, como por exemplo, promotores da endoglucanase *engXCA* e do operon que codifica o sistema de secreção tipo II *xps* (Ge and He, 2008; Hsiao *et al.*, 2005). Na tentativa de identificar possíveis promotores regulados por Clp em XAC, realizamos uma análise *in silico* com o programa RSTA (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>), utilizando sequências previamente descritas para XCC (Hsiao *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007; Ge and He, 2008; Lee *et al.*, 2003). A análise *in silico* possibilitou encontrar um possível sítio de ligação localizado no promotor do operon *xcs* (codifica um SST2) em XAC. Interessantemente esta sequência identificada no promotor de *xcsC* de XAC foi previamente caracterizada no operon *xps* parálogo de *xcs* em XCC (Ge and He, 2008). Não identificamos nenhum sítio de ligação para Clp no promotor do operon *xps* de XAC.

A ligação de Clp no promotor de *xcsC* de XAC foi confirmada por EMSA. Adicionalmente, também foi demonstrado que c-diGMP e não cAMP inibe a ligação de Clp no promotor de *xcsC* de XAC. Estes resultados confirmam que Clp responde aos aumentos de concentração do c-diGMP em XAC. Portanto, a ativação da via Rpf promove uma redução da concentração do c-diGMP aumentando a afinidade de Clp por seus promotores. Resultados similares foram descritos para Clp de XCC, onde se demonstrou que a ligação de Clp ao promotor de *engXCA* é inibida por c-diGMP. A inibição ocorre quando c-diGMP encontra-se ligado ao domínio de ligação a nucleotídeo cíclico (NBS) de Clp, que ocasiona mudanças em sua estrutura tridimensional (Chou, 2011; Tao *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2010).

De fato é interessante a presença do sítio de ligação de Clp no promotor de *xcs* de XAC, diferente do que ocorre em XCC, onde Clp liga-se ao *operon xps*. O sistema *xps* é considerado o principal sistema de secreção tipo II envolvido na secreção de endoglucanases e proteases extracelulares em *Xanthomonas*, estando presente em todos os genomas sequenciados de *Xanthomonas*. De maneira diferente o sistema *xcs* esta presente apenas em algumas espécies de *Xanthomonas* (Ryan *et al.*, 2011; Szczesny *et al.*, 2010).

Nocautes dos genes *xpsE* e *xcsC* de XAC foram obtidos para analisar a produção de fatores de virulência e patogenicidade. Observou-se uma diminuição da produção de endoglucanases e exoproteases em ambos mutantes. Entretanto a mutação em *xpsE* apresentou uma redução maior da atividade de endoglucanases e proteases extracelulares. Adicionalmente, o nocaute de *xpsE* mostrou uma menor formação de pontos de necrose no tecido do hospedeiro.

Nossos resultados confirmam que o operon *xps* de XAC, assim como em outras espécies de *Xanthomonas*, é o principal sistema de secreção tipo II, atuando na secreção de endoglucanases e proteases importantes no desenvolvimento da doença. Deste modo, podem-se propor as seguintes regulações em XAC (Fig. 117): 1) A expressão dos genes que codificam os fatores de virulência é ativada através da ligação de Clp nos seus promotores. 2) A regulação da expressão do operon *xps* pode ser realizada de modo indireto pelo sistema Rpf e Clp, através da atuação de outro fator de transcrição, ainda não identificado, cuja expressão é ativada por Clp. Isto explicaria porque a redução significativa da produção de fatores de virulência *in vitro* nas cepas mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp não ocasionou uma perda drástica da patogenicidade destes mutantes no hospedeiro. 3) Finalmente uma segunda via de sinalização pode funcionar em paralelo ao sistema Rpf durante o processo de infecção, reduzindo a concentração de c-diGMP nas células de XAC e consequentemente ativar a expressão dos fatores de virulência e do operon *xps*.

As três hipóteses envolvendo o controle da expressão e produção dos fatores de virulência em XAC não são exclusivas e podem atuar simultaneamente na regulação da patogenicidade de XAC. Adicionalmente, as vias regulatórias propostas podem ser ativadas em condições específicas por diferentes sinais do meio que chegam às células de XAC, como por exemplo, sinal proveniente do tecido do hospedeiro durante a infecção.

Figura 117. O sistema Rpf e a sinalização por c-diGMP regulam a mobilidade a biossíntese de goma xatana, o operon *xcs* e a produção de fatores de virulência em XAC. A molécula DSF é produzida por RpfF e seu acúmulo no meio ocasiona a autofosforilação da proteína quinase RpfC. RpfC transfere o grupo fosforil para o domínio regulador de resposta (RR) de RpfG, ativando a atividade de fosfodiesterase do seu domínio HD-GYP. O domínio HD-GYP hidrolisa o segundo mensageiro c-diGMP, reduzindo a sua concentração na célula de XAC. Deste modo, RpfG libera Clp da inibição por c-diGMP. Clp não complexada com c-diGMP pode se ligar a promotores específicos e aumentar a expressão de genes envolvidos com a mobilidade biossíntese de goma xatana, SST2 do operon *xcs* e produção de fatores de virulência em XAC. Clp pode também realizar seu controle de modo indireto, ativando a expressão de outro fator de transcrição (FT), que atuará regulando a expressão de genes induzidos pelo sistema Rpf. Adicionalmente, outros sistemas de sinalização podem funcionar em paralelo ao sistema Rpf controlando a concentração de c-diGMP em XAC. Estes sistemas podem ser formados por um componente (ativado diretamente por sinais externos) ou sistemas de dois componentes (onde o sinal externo é transduzido para o citoplasma através da modificação pós-traducional, fosforilação, p. ex.). HisK, domínio de histidina quinase; RR, domínio regulador de resposta; Hpt, domínio histidinafosforiltransferase; NBS, domínio de ligação a nucleotídeo; HTH, domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice. FT, fator de transcrição; EAL e HD-GYP, fosfodiesterases; GGDEF, diguanilato ciclase; Sensor, domínio sensor; DSF, Fator de sinalização difusível durante a comunicação celular em *Xanthomonas*. MI, membrana interna.

5.2.8. RpfG e Clp aumentam a sobrevivência de XAC dentro do hospedeiro

Os mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp mostraram uma pequena alteração no desenvolvimento do cancro cítrico, podendo ser observado uma redução dos pontos de necrose na folha após 10 dias da inoculação em laranja doce. Para confirmar a importância da via Rpf na patogenicidade de XAC comparamos as curvas de crescimentos de $\Delta rpfG$ e Δclp com as cepas selvagem e complementadas. Nestes ensaios observamos uma redução do crescimento dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp no tecido do hospedeiro, confirmando a importância de RpfG e Clp na sobrevivência de XAC durante o processo de infecção.

A capacidade de desenvolver o cancro cítrico dos mutantes $\Delta rpfG$ e Δclp sugere a existência de outras vias de sinalização, além do sistema Rpf, que são importantes para regular a produção de fatores de virulência em XAC. Recentemente foi caracterizado em XCC-B100 o sistema de dois componentes RavR/S que atua em paralelo a via Rpf, reduzindo a concentração de c-diGMP e ativando a produção de fatores de virulência através de Clp (He *et al.*, 2009). RavS é uma proteína quinase com domínio sensor PAS ativo em condições de baixas taxas de O₂ e RavR é um regulador de resposta fusionado a um domínio de fosfodiesterase (EAL) (He *et al.*, 2009). Contudo, faltam evidências experimentais para afirmar que os homólogos de RavS/RavR em XAC (XAC1991 e XAC1992, respectivamente) controlam a virulência.

Os diferentes modos de infecção de *Xanthomonas*, deste o estágio inicial da entrada da bactéria no tecido do hospedeiro, passando pelo bloqueio das respostas de defesa da planta até a formação de biofilme (infecção local) ou ganho de mobilidade (infecção sistêmica), podem ter promovido uma adaptação das vias de sinalização na célula, aumentando a importância de umas em detrimento a outras no controle da patogenicidade (Ryan *et al.*, 2011). Portanto, caracterizar os homólogos de RavS/R e identificar novas vias que regulam a produção dos

fatores de virulência em XAC são pontos essenciais para entender como a via Rpf responde aos diferentes hospedeiros e modos de infecção de *Xanthomonas*.

5.3. XAC1971_{PilZ} responde ao aumento da concentração de c-diGMP e promove a redução da mobilidade e o aumento da agregação celular em XAC

O segundo mensageiro bacteriano c-diGMP é produzido por enzimas diguanilato ciclases e hidrolisado por fosfodiesterases, cujas atividades são reguladas por sinais externos ou mudanças fisiológicas na célula (Jenal and Malone, 2006; Hengge, 2009). O c-diGMP governa a passagem do comportamento móvel de uma célula bacteriana para o estágio multicelular de biofilme regulando, a biossíntese de exopolissacarídeo, adesinas, pilus e flagelo (Gomelsky, 2011). Adicionalmente, a molécula c-diGMP também está envolvida na resposta a estresses do meio e no controle da produção de fatores de virulência (Pitzer *et al.*, 2011; Hengge, 2009; Cotter and Stibitz, 2007). Para realizar essas múltiplas regulações, o c-diGMP utiliza vários tipos de receptores incluindo PilZ, PelD, sítio-I de domínios GGDEF não catalíticos, domínios EAL não catalíticos, “riboswitches”, FleQ e Clp (Hengge, 2009; Hickman and Harwood, 2008; Leduc and Roberts, 2009; Schirmer and Jenal, 2009). Embora os mecanismos de atuação dos seus receptores precisam ainda ser melhores elucidados, estudos indicam que c-diGMP pode atuar nos níveis de transcrição, tradução, regulação pós-traducional da atividade enzimática, secreção e estabilidade de proteínas (Boehm *et al.*, 2009; Duerig *et al.*, 2009; Fang and Gomelsky, 2010; Pitzer *et al.*, 2011; Hickman and Harwood, 2008; Lee *et al.*, 2007; Lory *et al.*, 2009).

Estudos da mobilidade produção de fatores de virulência e patogenicidade dos mutantes carregando deleções dos homólogos de PilZ em XCC mostraram que XC_0965, XC_2249 e XC_3221 estão envolvidos com a patogenicidade sendo que XC_0965 e XC_2249 também atuam regulando a produção de endoglucanases e proteínas extracelulares em XCC (McCarthy *et al.*, 2008).

Os nocautes das quatro proteínas com domínio PilZ em XAC não mostraram alteração na patogenicidade, apesar da deleção de *XAC1971_{PilZ}* resultar num decréscimo de aproximadamente 25% da atividade de endoglucanases. Contudo nos ensaios de mobilidade no meio Eiken com os estes mutantes observamos um aumento da mobilidade de $\Delta XAC1971_{PilZ}$ e uma pequena redução no mutante $\Delta XAC3402_{PilZ}$.

O nosso grupo caracterizou a proteína *XAC1133_{PilZ}*, a qual não apresenta sítio de ligação para c-diGMP, mostrando que a deleção de *XAC1133_{PilZ}* resulta no aumento acentuado da mobilidade de XAC no meio SB. Adicionalmente, foi sugerido que *XAC1133_{PilZ}* pode regular a biogênese do PT4 através de sua interação com PilB e com o domínio EAL da proteína *XAC2398* (FimX) (Guzzo *et al.*, 2009). No entanto, neste projeto observamos que a deleção dos outros parálogos receptores PilZ, que diferentemente de *XAC1133_{PilZ}* possuem um possível sítio de ligação a c-diGMP, não mostrou alteração da mobilidade de XAC no meio SB.

Observamos um aumento da mobilidade do mutante $\Delta rpfF$ quando deletamos *XAC1971_{PilZ}* nesta cepa, produzindo então o mutante $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{PilZ}$. Corroborando com estes dados, também não observamos uma redução da mobilidade do nocaute $\Delta XAC1971$ quando transformado com a construção pBRA-*XAC0424*, onde promovemos a super-expressão da diguanilato ciclase *XAC0424*. Portanto, apesar do aumento da concentração de c-diGMP nas células de $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{PilZ}$ e $\Delta XAC1971_{PilZ}$ +pBRA-*XAC0424*, não houve uma redução da mobilidade de XAC, como era o esperado para estas condições. Adicionalmente, a cepa $\Delta rpfF\Delta XAC1971_{PilZ}$ não apresentou agregação celular, em contraste do que foi observado para o nocaute $\Delta rpfF$. O papel exercido pelo receptor *XAC1971_{PilZ}* perante estes resultados foi confirmado com a expressão em trans de *XAC1971_{PilZ}* na cepa mutante $\Delta rpfF\Delta XAC1971$, o que a reduziu a mobilidade e aumentou a agregação celular. Resultados similares foram descritos em *E. coli* para *ycgR* e *yhjH*, que codificam

respectivamente um receptor PilZ e uma fosfodiesterase com domínio EAL. O receptor YcgR_{PilZ} em resposta ao aumento de c-diGMP na célula, devido a deleção da fosfodiesterase *yhjH*, interage com as proteínas FliM, FliG e MotA reduzindo a mobilidade. Diferente de $\Delta yhjH$ HA, a cepa $\Delta yhjH\Delta ycgR$ não mostrou redução da sua mobilidade (Ryjenkov *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2010). Infelizmente os alvos de interação dos homólogos de XAC1971_{PilZ} em *Xanthomonas* ainda não são conhecidos.

Deste modo, a proteína XAC1971_{PilZ} contrapõe-se a regulação do sistema Rpf, onde XAC1971_{PilZ}, em resposta ao aumento de c-diGMP na célula, inibe a mobilidade e ativa a agregação celular em XAC. O complexo formado XAC1971_{PilZ}-cdiGMP, por exemplo, pode atuar no controle positivo da expressão e montagem de fímbrias adesivas na superfície da célula, ativar a polimerização do PT4 e/ou inibir a produção de goma xantana em XAC. De acordo com nossos resultados, todas essas regulações, comprometeriam a mobilidade de XAC (Guzzo *et al.*, 2009; Gottig *et al.*, 2009) (Figura 118).

Figura 118. Modelo de regulação da mobilidade pela proteína XAC1971_{PilZ}. O mutante $\Delta rpjF$ apresenta a mobilidade reduzida enquanto a cepa $\Delta rpjF \Delta XAC1971_{PilZ}$ exibe uma mobilidade similar a da cepa de XAC selvagem no meio SB. No modelo, o aumento de c-diGMP na célula de XAC, seja no *background* do mutante $\Delta rpjF$ ou com a super-expressão da diguanilato ciclase XAC0424, o receptor XAC1971_{PilZ} torna-se ativo e pode inibir a produção de goma xantana e promover a biogênese do PT4 ou fímbrias adesivas, como por exemplo FhaB (Gottig *et al.*, 2009). O PT4 e FhaB são reguladores negativos da mobilidade enquanto a goma xantana contribui para a dispersão das células de XAC no meio semi-sólido.

A análise da estrutura primária dos homólogos de XAC1971_{PilZ} em diferentes espécies de *Xanthomonas* revelou uma elevada homologia. Contudo os resíduos essenciais para a interação do receptor PilZ com c-diGMP são modificados em XAC1971_{PilZ} e seus homólogos, ao invés de RxxxR e DxSxxG tem-se RxxxK e HxSxxG (Figura 119).

XAC1971	MSALGTLAPSADAELFADTLSCQLQLPAGFRAGSDAGAQSAETLLRSLGQVEDLRSEET
XCC_2234	MSTLGTLPAADELTFADTLSCQLQLPAGFHVTDAPGSHATAETLLRSLGQVEDLRSEDS
XOO_2585	MSTLGTLPAPSADAELFADTLSCQLQLPASFRAGSDAGTHSAAETLLRSLGQVEDLRSEET
XCV2018	MSALGTLAPSADAELFADTLSCQLQLPAGFRAGSDAGAHSAETLLRSLGQVEDLRSEET
XC8004_2249	MSTLGTLPAADELTFADTLSCQLQLPAGFHVTDAPGSHATAETLLRSLGQVEDLRSEDS
	RXXXXR DXSXXG
XAC1971	GEDRGELPLLVRMDAKLDLMLALIGRLVRQGDGSLSQGMVHWSVRGIRLSCATSHPPGT
XCC_2234	SEERGELPLLVRMDAKLDLMLALIGRLVRQSDTRLALGTVHWSVRGIRLSPHAHPPGT
XOO_2585	SEDRGELPLLVRMDAKLDLMLALIGRLVRHGDGSLSQGLVHWSVRGIRLSCASSHAPGT
XCV2018	SEDRGELPLLVRMDAKLDLMLALIGRLVRQGDGSLSQGMVHWSVRGIRLSCATSHPPGT
XC8004_2249	SEERGELPLLVRMDAKLDLMLALIGRLVRQSDTRLALGTVHWSVRGIRLSPHAHPPGT
XAC1971	TGSVCLQPSDWLPELVQLPATVLANASDGHVDVWLWLRFAPLAPGLQDALERHLFRLHRRQ
XCCb100_2234	TGSVLLQPSDWLPELLQLPADVLASASDGQHHWLWLRFAPLGTGLQDALERHLFRLHRRQ
XOO_2585	TGSVCLQPSDWLPELVQLPATVLANASDGHVDVWLWLRFAPLAPGLQDALERHLFRLHRRQ
XCV2018	TGAVCLQPSDWLPELVQLPATVLANASDGHVDVWLWLRFAPLAPGLQDALERHLFRLHRRQ
XC8004_2249	TGSVLLQPSDWLPELLQLPADVLASASDGQHHWLWLRFAPLGTGLQDALERHLFRLHRRQ
XAC1971	IADARRQR
XCCb100_2234	IADARRQR
XOO_2585	VADARRQR
XCV2018	IADARRQR
XC8004_2249	IADARRQR

Figura 119. Alinhamento das sequências de aminoácidos dos homólogos da proteína PilZ XAC1971 em diferentes espécies de *Xanthomonas*. XAC, *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*; XCCb100, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* B100; XOO, *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*; XCV, *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*; XC8004, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 8004. Em vermelho destacam-se os resíduos R73, K77, H102, S104 e G107 que supostamente estariam envolvidos com a interação de XAC1971 com c-diGMP. Em verde destacam-se os resíduos RxxxR e DxSxxG importantes para formar interações entre proteínas da família PilZ e a molécula de c-diGMP.

A substituição dos resíduos R73L e K77I, do motivo RxxxK de XAC1971_{PilZ}, comprometeu a reversão do fenótipo do mutante $\Delta rpfF \Delta XAC1971_{PilZ}$ e não foi observado a redução da mobilidade e formação de agregados celulares que são fenótipos característicos de $\Delta rpfF$. Inicialmente, estes resultados tinham sugerido que os resíduos R73 e K77 poderiam estar envolvidos com a ligação de XAC1971_{PilZ} a c-diGMP. No entanto, recentemente a estrutura de um dos homólogos de XAC1971_{PilZ} (XCCb100_2234) foi obtida por cristalografia e depositada no banco PDB (<http://www.pdb.org/pdb/>) com o código de acesso 3PH1. A estrutura de XCCb100_2234 revelou a formação de um tetrâmero, onde a região entre os resíduos 68 a 93 forma uma estrutura α -hélice que permite a interação entre suas subunidades. Diferentemente do esperado, os resíduos R_{73xxx}K₇₇ encontram-se numa mesma α -hélice entre as subunidades que constituem o tetrâmero, sendo que R73 da cadeia A interage através de interações iônicas com os resíduos E53 e D54 da cadeia B, desta mesma

maneira o resíduo K77 através de interações iônicas interage com os resíduos D75 e D79 da cadeia B. Estas interações estabelecem contatos e estabilizam a estrutura quaternária do homólogo de XAC1971. As substituições geradas em nossos estudos para os resíduos R73L e K77I podem ter desestabilizado estas interações entre as subunidades. Entretanto, não podemos descartar a hipótese que XAC1971 e seus homólogos possam interagir com c-diGMP de uma maneira diferente do observado até agora para outros domínios PilZ. A Figura 120 mostra que as cadeias laterais dos resíduos R106 e R109 na estrutura de XCCb100_2234 estão próximos aos resíduos do motivo $H_{102}xG_{104}xxS_{10}$. Deste modo, é possível que ainda exista um sítio de ligação a c-diGMP nesta família de proteínas. Contudo, esta hipótese deve ser testada experimentalmente.

5.4. O regulador pós-transcricional CsrA atua em paralelo ao sistema Rpf controlando a concentração de c-diGMP, mobilidade e virulência em XAC

Nossos resultados mostraram que a deleção de *rpfG* elevou a concentração de c-diGMP na célula, promovendo uma redução da mobilidade, produção de exopolissacarídeos, fatores de virulência e também aumentando a agregação celular em XAC. O mutante $\Delta csrA$ apresentou fenótipos similares, exceto redução da atividade de proteases extracelulares e maior comprometimento da patogenicidade que foi demonstrada através da curva de sobrevivência dentro do hospedeiro.

A complementação de $\Delta csrA$ restaurou a mobilidade produção de exopolissacarídeos, atividade de endoglucanases e a patogenicidade no hospedeiro. Adicionalmente, a super-expressão das fosfodiesterases RpfG e XAC1887 suprimiram os fenótipos do nocaute $\Delta csrA$ restaurando a mobilidade, produção de exopolissacarídeo e a atividade de endoglucanases em XAC.

A expressão em trans do fator de transcrição Clp restaurou completamente a atividade de endoglucanases do mutante $\Delta csrA$, mas não a mobilidade. Contudo a atividade de endoglucanases em $\Delta csrA$ suprimido por *clp* foi de aproximadamente 30% menos que a observada na complementação de Δclp transformada com a mesma construção. Esta observação sugere uma regulação do tipo “dose-dependente” onde um aumento da concentração do fator de transcrição na célula eleva sua ligação a promotores específicos, o que gera também um aumento da expressão gênica. Portanto, estes dados sugerem a existência de algum fator nas células de $\Delta csrA$ que inibe em parte a afinidade de Clp por seus promotores.

A quantificação de c-diGMP nas células de XAC selvagem, $\Delta csrA$ e $\Delta csrA$ complementado com pUFR047-*csrA*, confirmou um aumento da concentração de c-diGMP nas células com a deleção para *csrA*. Este resultado explica porque os fenótipos descritos para os mutantes $\Delta rpfG$ e $\Delta csrA$ são similares em vários aspectos.

Nas enterobactérias *E. coli* e *Salmonella Typhimurium* foi demonstrado que CsrA liga-se a sequência Shine-Delgarno de cinco RNA mensageiros que codificam proteínas GGDEF. O bloqueio de CsrA sobre a tradução destes RNA mensageiros inibe o aumento da concentração de c-diGMP na célula (Jonas *et al.*, 2010; Jonas *et al.*, 2008). Este mecanismo regulatório pode explicar em parte os fenótipos observados com a deleção de *csrA* em XAC (Figura 121).

CsrA também pode regular a tradução de outros RNA mensageiros, como por exemplo, codificadores do SST3 e fatores de transcrição ativadores da virulência, o que elucidaria o seu controle sobre a patogenicidade de XAC. Entretanto, nenhum RNA mensageiro alvo direto de CsrA em *Xanthomonas* foi confirmado, apesar de existirem alguns resultados publicados para mutantes dos homólogos de *csrA* em outras espécies de *Xanthomonas* como XCC e XOO (Chao *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011).

Figura 121. Modelo do controle de CsrA sobre a concentração de c-diGMP e virulência em XAC. A comunicação celular promovida por DSF ativa a via Rpf, que através de RpfG reduz a concentração de c-diGMP na célula. A redução de c-diGMP libera Clp para ligar nos promotores de genes ativadores da mobilidade e fatores de virulência. Por outro lado, a deleção de *csrA* aumenta a concentração de c-diGMP em XAC, o que reduz a mobilidade inibe a ligação de Clp no promotor de *xps* (SST2) e diminui a produção de endoglucanases. Adicionalmente, em $\Delta csrA$ tem-se um aumento da agregação celular. O efeito de CsrA sobre a concentração de c-diGMP em XAC pode estar relacionado com sua função no controle pós-transcricional, onde se liga ao sítio Shine-Dalgarno de RNA mensageiros codificadores de diguanilato ciclastes. Deste modo, CsrA bloqueia a tradução destes RNA mensageiros. No mutante $\Delta csrA$, a ausência do bloqueio na tradução de RNA mensageiros codificadores de diguanilato ciclastes específicas, promove o aumento de c-diGMP na célula de XAC. CsrA também ativa a virulência de XAC aumentando sua sobrevivência dentro do hospedeiro. A concentração de c-diGMP também pode ser regulada por sinais que chegam as células de XAC e ativa proteínas diguanilato ciclastes (GGDEF) e fosfodiesterases (EAL). Sensor, domínio sensor; HisK, domínio de histidina quinase; RR, domínio regulador de resposta; Hpt, domínio histidinafosfotransferase; NBS, domínio de ligação a nucleotídeo; HTH, domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice; GGDEF, diguanilato ciclastase; EAL e HD-GYP, fosfodiesterases; DSF, Fator de sinalização difusível durante a comunicação celular em *Xanthomonas*. MI, membrana interna.

5.5. Investigando uma possível sobreposição das vias de sinalização por c-diGMP e (p)ppGpp em XAC

Observamos no mutante $\Delta rpoZ$ uma redução nos fenótipos de mobilidade, produção de goma xantana e fatores de virulência. Além disso, mostrou uma menor capacidade de sobrevivência dentro do hospedeiro. As complementações de $\Delta rpoZ$ com as construções contendo seu *operon* (constituído por *rpoZ* e *spoT*) e somente pelo gene *rpoZ* restauraram todos estes fenótipos. A deleção do homólogo de *rpoZ* em *Mycobacterium smegmatis* e um mutante de *Streptomyces kasugaensis* com *frameshift* em *rpoZ*, similar ao mutante *rpoZ* que caracterizamos em XAC, apresentaram um efeito pleiotrópico com redução da mobilidade tipo *sliding* e virulência (Mathew *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2002).

A expressão induzida de *rpfG*, sob o controle do promotor BAD, ou constitutiva sob o controle do promotor *lac*, suprimem os efeitos da mutação em *rpoZ*, restaurando a mobilidade e a produção de fatores de virulência em XAC. Contudo a construção usada na complementação de $\Delta rpfG$, na qual o gene *rpfG* está clonado no vetor pUFR047 sob o controle do seu próprio promotor, não foi capaz de suprimir a mutação em *rpoZ*. Estes dados sugerem que a presença da subunidade ômega (ω), codificada por *rpoZ*, no *cerne* da RNA polimerase pode ser essencial para ativar a expressão de *rpfG* em XAC.

A quantificação de c-diGMP nas células de $\Delta rpoZ$ revelou um aumento da concentração de c-diGMP de aproximadamente 2.5 vezes em relação a cepa selvagem de XAC. A complementação de $\Delta rpoZ$ retornou com os níveis normais de c-diGMP na célula. Portanto, estes resultados indicam que *rpoZ* é importante para regular a concentração de c-diGMP em XAC, podendo ser realizado de modo indireto através do seu controle sobre a expressão de *rpfG*.

Em XCC a subunidade ω foi necessária para a estabilidade e o aumento da atividade do *cerne* da RNA polimerase *in vitro* (Cheng *et al.*, 2010). Contudo, não existe na literatura uma descrição sobre a deleção de *rpoZ* de XCC, confirmando estes resultados *in vivo*.

Podemos propor que a mutação em *rpoZ* de XAC também reduz a atividade da sua RNA polimerase devido a desestabilização da interação entre as subunidades do *cerne*. Consequentemente tem-se um comprometimento da interação do *cerne* da RNA polimerase com fator(es) sigmas específicos reguladores dos fenótipos de mobilidade produção de goma xantana e patogenicidade em XAC. É importante ressaltar, que este efeito seria mais drástico para alguns promotores, como o próprio promotor de *rpfG*, em relação a outros, como os promotores BAD e *lac*, cuja expressão de *rpfG* não mostrou ser afetada e foram capazes de suprimir a mutação em $\Delta rpoZ$.

O comprometimento na mobilidade e a redução da produção de goma xantana e fatores de virulência em $\Delta rpoZ$ podem ser explicados pelo aumento da concentração de c-diGMP na célula. No entanto, a expressão constitutiva de *rpfG* no mutante *rpoZ* não restaurou a sua patogenicidade. Desta forma, *rpoZ* pode regular outros fatores importantes para a sobrevivência e virulência de XAC, como por exemplo, componentes do SST3, que é essencial para bloquear respostas de defesa do hospedeiro e promover a infecção.

O acúmulo de (p)ppGpp também foi analisado nos mutantes $\Delta rpoZ$, $\Delta relA$ e $\Delta rpoZ\Delta relA$ de XAC. Estes mutantes foram submetidos ao estresse por carência de aminoácidos e foi observada a redução no acúmulo de (p)ppGpp em $\Delta rpoZ$ e $\Delta relA$ e nenhuma produção de (p)ppGpp no cepa $\Delta rpoZ\Delta relA$. Estes dados sugerem que RelA é a principal (p)ppGpp sintetase em XAC e ainda *rpoZ* pode aumentar o acúmulo de (p)ppGpp em XAC regulando a expressão de *relA*, como demonstrado para *E. coli* (Chatterji *et al.*, 2007).

O pequeno acúmulo de (p)ppGpp observado na cepa $\Delta relA$ pode ser resultado da atividade do domínio (p)ppGpp sintetase de SpoT, que somente nestas condições, em presença de *rpoZ*, mostrou ser ativo. Portanto, esses resultados sugerem uma função regulatória adicional para *rpoZ* no controle da expressão de *spoT* e/ou de fatores, ainda

desconhecidos, que controlam a atividade dos domínios de fosfohidrolase e (p)ppGpp sintetase de SpoT em XAC.

A cepa $\Delta rpfG$ mostrou um menor acúmulo de (p)ppGpp em resposta a carência de aminoácidos, indicando que o aumento da concentração de c-diGMP pode inibir o acúmulo de (p)ppGpp em XAC. Em *E. coli* inibidores do processo de tradução promove o aumento de c-diGMP e a redução de (p)ppGpp, ativando a expressão de fatores envolvidos com a formação de biofilme e virulência (Boehm *et al.*, 2009).

O crescimento das cepas $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpoZ\Delta relA$ foi reduzido em presença de 3-AT, um inibidor da biossíntese de histidina, indicando que *rpoZ* atua no aumento da expressão do operon *his* em XAC. Em *Salmonella typhimurium* o operon *his* é ativado em decorrência ao acúmulo de (p)ppGpp na célula (Stephens *et al.*, 1975). No entanto, as cepas $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpoZ\Delta relA$ apresentaram um menor acúmulo de (p)ppGpp. Por outro lado, a cepa $\Delta rpoZ$ complementada com pUF047-*rpoZ-spoT* não teve seu crescimento afetado com 3-AT e mostrou um menor acúmulo de (p)ppGpp. Portanto, nossos resultados sugerem que outros fatores ainda não identificados, além do acúmulo de (p)ppGpp, sejam importantes para regular a expressão do operon *his* em XAC.

Nestes estudos, onde iniciamos a caracterização dos fatores que controlam o metabolismo de (p)ppGpp em XAC, também identificamos a orf XAC1185, a qual possui homologia (54% de identidade) com o domínio de fosfohidrolase de SpoT_{HD}. Nossos resultados mostram que a expressão induzida de XAC1185, sob controle do promotor BAD, foi capaz de reduzir o acúmulo de (p)ppGpp somente na cepa $\Delta rpoZ$, mas não na cepa selvagem de XAC. Portanto, a presença de *rpoZ* na célula de XAC inibe a atividade de fosfohidrolase de XAC1185. Isto explica em parte a redução de (p)ppGpp observada em $\Delta rpoZ$ e $\Delta rpoZ\Delta relA$.

Nossa hipótese da existência de sobreposição entre as vias reguladas por (p)ppGpp e c-diGMP em XAC se apóia nos seguintes resultados: 1) A cepa $\Delta rpoZ$ apresenta um aumento da concentração de c-diGMP na célula e fenótipos similares aos mutantes $\Delta rpfF$ -C-G. A mutação em *rpoZ* é suprimida com a expressão induzida ou constitutiva de *rpfG*, exceto a patogenicidade. 2) A deleção de *rpfG* reduziu o acúmulo de (p)ppGpp nas células de XAC. A expressão de *rpfG* pode ser ativada por *rpoZ* (Figura 122).

Figura 122. Modelo de sobreposição das vias reguladas por c-diGMP e (p)ppGpp em XAC. Durante o *quorum-sensing* RpfF produz DSF que acumulada no meio se liga ao domínio sensor de RpfC. RpfC se autofosforila e transfere o grupo fosforil para o domínio regulador de resposta (RR) de RpfG. RpfG fosforilada atua através do seu domínio HD-GYP reduzindo a concentração de c-diGMP na célula. A redução de c-diGMP libera Clp para ligar a promotores específicos, ativando a mobilidade e produção de fatores de virulência. A expressão de *rpfG* é regulada de forma positiva pelo produto de *rpoZ*, a subunidade ômega (ω) da RNA polimerase. A deleção de *rpoZ* pode reduzir a expressão de *rpfG* e consequentemente tem-se um aumento de c-diGMP na célula. A síntese de (p)ppGpp por RelA é inibida em parte por c-diGMP produzido por proteínas GGDEF. Adicionalmente, a subunidade ω também pode ativar a expressão de *spoT* e *relA* e genes de virulência e reprimir a expressão de XAC1185_{SpoT-HD}. A concentração de (p)ppGpp é regulada por diferentes sinais que chegam até as proteínas SpoT e RelA. A interação de (p)ppGpp com o *cerne* da RNA polimerase é potencializada pela subunidade ω . A subunidade ω pode regular a expressão de vários genes por aumentar a estabilidade do *cerne* da RNA polimerase e regular a interação do *cerne* com fatores sigmas ($\sigma 70$, $\sigma 54$ e $\sigma 32$). As setas em vermelho indicam os pontos que identificamos com possível sobreposição das vias reguladas por (p)ppGpp e c-diGMP em XAC. HisK, domínio de histidina quinase; RR, domínio regulador de resposta; Hpt, domínio histidinafosfotransferase; NBS, domínio de ligação a nucleotídeo; HTH, domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice; HD-GYP, fosfodiesterase; GGDEF, diguanilato ciclase; Sensor, domínio sensor; DSF, Fator de sinalização difusível durante a comunicação celular em *Xanthomonas*. MI, membrana interna.

6. Conclusões

A caracterização de 54 mutantes não-polares permitiu a identificação de genes envolvidos com a regulação da mobilidade biossintese de goma xantana, produção de fatores de virulência e patogenicidade em XAC.

A deleção dos genes *rpfF-C-G*, os quais participam da via do *quorum-sensing*, comprometeu a mobilidade biossintese de goma xantana, produção de fatores de virulência e também a sobrevivência de XAC dentro do hospedeiro. Este efeito pleiotrópico foi ocasionado principalmente pelo aumento da concentração do segundo mensageiro c-diGMP na célula, o qual inibe a ligação do fator de transcrição Clp a promotores específicos. Esse efeito foi demonstrado *in vitro* pela técnica EMSA onde observamos a inibição de c-diGMP sobre a interação de Clp com o promotor do operon *xcs* (SST2). Além disso, resultados de interação proteína-proteína sugerem uma regulação um tanto mais elaborada entre o domínio HD-GYP de RpfG com proteínas diguanilato ciclases em *Xanthomonas*. Ao contrário do ocorre com XCC, a mobilidade de XAC em meio semi-sólido e a produção de goma xantana são aumentados com a deleção de genes codificadores do pilus tipo 4.

Contrapondo-se à regulação positiva do *quorum-sensing*, o receptor XAC1971_{PilZ} responde ao aumento de c-diGMP na célula promovendo a agregação celular e inibindo a mobilidade de XAC. XAC1971_{PilZ} possivelmente exerce sua função através de controle pós-traducional interagindo com outros fatores que regulam a biogênese do pilus tipo 4, biossintese de goma xantana e/ou expressão de fímbrias adesivas.

O aumento de c-diGMP também foi verificado nos mutantes $\Delta csrA$ e $\Delta rpoZ$, cuja expressão em trans de *rpfG* suprimiu a diminuição da mobilidade agregação, redução de goma xantana e produção de fatores de virulência, mas não a perda acentuada da patogenicidade destes mutantes.

O fator de regulação pós-transcricional CsrA pode atuar no controle da síntese de c-diGMP através do bloqueio da tradução de RNA mensageiros codificadores de diguanilato ciclases específicas e também de fatores que ativam a patogenicidade e consequentemente a sobrevivência de XAC dentro do hospedeiro.

O gene *rpoZ*, que codifica a subunidade ω da RNA polimerase é essencial para a formação e estabilidade do *cerne* podendo regular a sua interação com diferentes fatores sigmas, controlando a expressão de genes envolvidos no metabolismo de c-diGMP e (p)ppGpp, como por exemplo: *rpfG*, *spoT*, *relA* e *XAC1185*. O fenótipo pleiotrópico de $\Delta rpoZ$ sugere uma sobreposição das vias do *quorum-sensing*, que regula a concentração de c-diGMP em *Xanthomonas* e a sinalização por (p)ppGpp cuja interação com o *cerne* da RNA polimerase é potencializado pela subunidade ω . Além disso, os resultados sugerem que a completa perda da patogenicidade na ausência da subunidade ω é acarretada pela deficiência no controle transcricional e/ou alteração de (p)ppGpp e não por um aumento de c-diGMP nas células de XAC.

Finalmente identificamos reguladores inéditos que podem atuar no controle transcricional, pós-transcricional e pós-traducional, envolvidos com o *quorum-sensing* e metabolismo de c-diGMP e (p)ppGpp em *Xanthomonas*. Através da sinalização celular estes reguladores promovem a adaptação de XAC à diferentes ambientes, inclusive na sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Alguns destes fatores parecem atuar de modo particular em XAC, o que é coerente com os mecanismos distintos de infecção e os diferentes tecidos e hospedeiros que as espécies de *Xanthomonas* podem colonizar.

7. Referências

- Abe, A. (2009). [Bacterial secretion systems: their function and contribution to disease process]. *Kansenshogaku Zasshi* 83(2): 94-100.
- Aberg, A., Shingler, V. & Balsalobre, C. (2006). (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Mol Microbiol* 60(6): 1520-1533.
- Alegria, M. C., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., da Silva, A. C. & Farah, C. S. (2004). 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* 186(18): 6186-6197.
- Alegria, M. C., Souza, D. P., Andrade, M. O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., da Silva, A. C. & Farah, C. S. (2005). Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J Bacteriol* 187(7): 2315-2325.
- Alm, R. A., Boder, A. J., Free, P. D. & Mattick, J. S. (1996a). Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 178(1): 46-53.
- Amikam, D. & Galperin, M. Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22(1): 3-6.
- Andrade, M. O., Alegria, M. C., Guzzo, C. R., Docena, C., Rosa, M. C., Ramos, C. H. & Farah, C. S. (2006). 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* 62(2): 537-551.
- Ansong, C., Yoon, H., Porwollik, S., Mottaz-Brewer, H., Petritis, B. O., Jaitly, N., Adkins, J. N., McClelland, M., Heffron, F. & Smith, R. D. (2009). Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation. *PLoS One* 4(3): e4809.
- Appleby, J. L., Parkinson, J. S. & Bourret, R. B. (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86(6): 845-848.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* 23(12): 469-472.
- Arnold, R., Jehl, A. & Rattei, T. Targeting effectors: the molecular recognition of Type III secreted proteins. *Microbes Infect* 12(5): 346-358.
- Baysse, C., Cullinane, M., Denervaud, V., Burrowes, E., Dow, J. M., Morrissey, J. P., Tam, L., Trevors, J. T. & O'Gara, F. (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151(Pt 8): 2529-2542.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A. & Ielpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 50(2): 145-152.
- Bhatt, S., Romeo, T. & Kalman, D. (2011). Honing the message: post-transcriptional and post-translational control in attaching and effacing pathogens. *Trends Microbiol* 19(5): 217-224.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P. & Wandersman, C. (1997). Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters. *Folia Microbiol (Praha)* 42(3): 179-183.

- Boch, J. & Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 48: 419-436.
- Boehm, A., Steiner, S., Zaehring, F., Casanova, A., Hamburger, F., Ritz, D., Keck, W., Ackermann, M., Schirmer, T. & Jenal, U. (2009). Second messenger signalling governs Escherichia coli biofilm induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol* 72(6): 1500-1516.
- Bonas, U. (1994). hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 192: 79-98.
- Brencic, A. & Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of Pseudomonas aeruginosa RsmA. *Mol Microbiol* 72(3): 612-632.
- Brunings, A. M. & Gabriel, D. W. (2003). Xanthomonas citri: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 4(3): 141-157.
- Buttner, D. & Bonas, U. (2002). Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* 21(20): 5313-5322.
- Buttner, D. & Bonas, U. (2009). Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* 34(2): 107-133.
- Cappelletti, P. A., Dos Santos, R. F., do Amaral, A. M., Homem, R. A., Dos Santos Souza, T., Machado, M. A. & Farah, C. S. Structure-Function Analysis of the HrpB2-HrcU Interaction in the Xanthomonas citri Type III Secretion System. *PLoS One* 6(3): e17614.
- Cernadas, R. A., Camillo, L. R. & Benedetti, C. E. (2008). Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens Xanthomonas axonopodis pv. citri and Xanthomonas axonopodis pv. aurantifolii. *Mol Plant Pathol* 9(5): 609-631.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U. & Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17084-17089.
- Chan, J. W. & Goodwin, P. H. (1999). The molecular genetics of virulence of Xanthomonas campestris. *Biotechnol Adv* 17(6): 489-508.
- Chang, W. H., Lee, M. C., Yang, M. T. & Tseng, Y. H. (2005). Expression of heat-shock genes groESL in Xanthomonas campestris is upregulated by CLP in an indirect manner. *FEMS Microbiol Lett* 243(2): 365-372.
- Chao, N. X., Wei, K., Chen, Q., Meng, Q. L., Tang, D. J., He, Y. Q., Lu, G. T., Jiang, B. L., Liang, X. X., Feng, J. X., Chen, B. & Tang, J. L. (2008). The rsmA(Xcc) of Xanthomonas campestris pv. campestris is involved in the control of various cellular processes, including pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* 21(4): 411-423.
- Chatterji, D., Ogawa, Y., Shimada, T. & Ishihama, A. (2007). The role of the omega subunit of RNA polymerase in expression of the relA gene in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* 267(1): 51-55.
- Chen, Y., Shiue, S. J., Huang, C. W., Chang, J. L., Chien, Y. L., Hu, N. T. & Chan, N. L. (2005). Structure and function of the XpsE N-terminal domain, an essential component of the Xanthomonas campestris type II secretion system. *J Biol Chem* 280(51): 42356-42363.
- Cheng, C. Y., Yu, Y. J. & Yang, M. T. (2010). Coexpression of omega subunit in E. coli is required for the maintenance of enzymatic activity of Xanthomonas campestris pv. campestris RNA polymerase. *Protein expression and purification* 69(1): 91-98.
- Chin, K. H., Lee, Y. C., Tu, Z. L., Chen, C. H., Tseng, Y. H., Yang, J. M., Ryan, R. P., McCarthy, Y., Dow, J. M., Wang, A. H. & Chou, S. H. (2010). The cAMP receptor-

- like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* 396(3): 646-662.
- Chou, S. H. (2011). Delicate conformational changes of a protein in the CRP family lead to dramatic functional changes via binding of an alternate secondary messenger molecule. *Virulence* 2(2): 152-157.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M. G., Folcher, M., Jenö, P., Grzesiek, S. & Jenal, U. (2007). DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10): 4112-4117.
- Christen, M., Kulasekara, H. D., Christen, B., Kulasekara, B. R., Hoffman, L. R. & Miller, S. I. (2010). Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* 328(5983): 1295-1297.
- Cianciotto, N. P. (2009). Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol* 4(7): 797-805.
- Coburn, B., Sekirov, I. & Finlay, B. B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* 20(4): 535-549.
- Cotter, P. A. & Stibitz, S. (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* 10(1): 17-23.
- Crossman, L. & Dow, J. M. (2004b). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect* 6(6): 623-629.
- da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorri, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A., Silva, C., de Souza, R. F., Spinola, L. A., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C. & Kitajima, J. P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417(6887): 459-463.
- Dalebroux, Z. D., Svensson, S. L., Gaynor, E. C. & Swanson, M. S. (2010). ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(2): 171-199.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M. N., Durand, K. & Jacques, M. A. Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Appl Environ Microbiol* 76(20): 6787-6796.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S. & Jacques, M. A. (2009). Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol Plant Microbe Interact* 22(6): 747-757.
- Das, A., Rangaraj, N. & Sonti, R. V. (2009). Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* 22(1): 73-85.
- Deery, W. J., Gao, T., Ammann, R. & Gomer, R. H. (2002). A single cell density-sensing factor stimulates distinct signal transduction pathways through two different receptors. *The Journal of biological chemistry* 277(35): 31972-31979.
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694(1-3): 149-161.

- Deutscher, J., Herro, R., Bourand, A., Mijakovic, I. & Poncet, S. (2005). P-Ser-HPr--a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochimica et biophysica acta* 1754(1-2): 118-125.
- Domingues, M. N., De Souza, T. A., Cernadas, R. A., de Oliveira, M. L., Docena, C., Farah, C. S. & Benedetti, C. E. (2010). The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Molecular plant pathology* 11(5): 663-675.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X. & Tang, J. L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10995-11000.
- Dow, J. M., Fouhy, Y., Lucey, J. F. & Ryan, R. P. (2006). The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol Plant Microbe Interact* 19(12): 1378-1384.
- Dow, J. M., Osbourn, A. E., Wilson, T. J. & Daniels, M. J. (1995). A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Plant Microbe Interact* 8(5): 768-777.
- Dow, M. (2008). Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. *Sci Signal* 1(21): pe23.
- Dow, M., Newman, M. A. & von Roepenack, E. (2000). The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* 38: 241-261.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Suzuki, K., Jones, A. D., Pandit, P., Romeo, T. & Babitzke, P. (2003). CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J Bacteriol* 185(15): 4450-4460.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B. & Jenal, U. (2009). Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* 23(1): 93-104.
- Dunger, G., Relling, V. M., Tondo, M. L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E. G. & Ottado, J. (2007a). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Archives of microbiology* 188(2): 127-135.
- Egener, T., Sarkar, A., Martin, D. E. & Reinhold-Hurek, B. (2002). Identification of a NifL-like protein in a diazotroph of the beta-subgroup of the Proteobacteria, *Azoarcus* sp. strain BH72. *Microbiology* 148(Pt 10): 3203-3212.
- Fang, X. & Gomelsky, M. (2010). A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol* 76(5): 1295-1305.
- Felek, S. & Krukonis, E. S. (2009). The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence. *Infect Immun* 77(2): 825-836.
- Fouhy, Y., Lucey, J. F., Ryan, R. P. & Dow, J. M. (2006). Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res Microbiol* 157(10): 899-904.
- Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V. & Waksman, G. (2009). Structure of a type IV secretion system cerne complex. *Science* 323(5911): 266-268.
- Furutani, A., Takaoka, M., Sanada, H., Noguchi, Y., Oku, T., Tsuno, K., Ochiai, H. & Tsuge, S. (2009). Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 22(1): 96-106.
- Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* 188(12): 4169-4182.
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. & Koonin, E. V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* 203(1): 11-21.

- Ge, C. &He, C. (2008). Regulation of the type II secretion structural gene xpsE in *Xanthomonas campestris* Pathovar *campestris* by the global transcription regulator Clp. *Curr Microbiol* 56(2): 122-127.
- Gentry, D. R. &Burgess, R. R. (1989). rpoZ, encoding the omega subunit of Escherichia coli RNA polymerase, is in the same operon as spoT. *J Bacteriol* 171(3): 1271-1277.
- Gomelsky, M. (2011). cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all! *Mol Microbiol* 79(3): 562-565.
- Gomis-Ruth, F. X., Sola, M., de la Cruz, F. &Coll, M. (2004). Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr Pharm Des* 10(13): 1551-1565.
- Gottig, N., Garavaglia, B. S., Garofalo, C. G., Orellano, E. G. &Ottado, J. (2009). A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One* 4(2): e4358.
- Gottwald, T. R., Sun, X., Riley, T., Graham, J. H., Ferrandino, F. &Taylor, E. L. (2002). Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology* 92(4): 361-377.
- Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J. &Achor, D. S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol* 5(1): 1-15.
- Guo, X., Zou, H., Li, Y., Zou, L. &Chen, G. (2010). [HrpD6 gene determines *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* to trigger hypersensitive response in tobacco and pathogenicity in rice]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50(9): 1155-1163.
- Guo, Y., Figueiredo, F., Jones, J. &Wang, N. (2011). HrpG and HrpX Play Global Roles in Coordinating Different Virulence Traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *Mol Plant Microbe Interact* 24(6): 649-661.
- Gurlebeck, D., Thieme, F. &Bonas, U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol* 163(3): 233-255.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. &Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology* 177(14): 4121-4130.
- Guzzo, C. R., Salinas, R. K., Andrade, M. O. &Farah, C. S. (2009). PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* 393(4): 848-866.
- Haddadin, F. T., Kurtz, H. &Harcum, S. W. (2009). Serine hydroxamate and the transcriptome of high cell density recombinant *Escherichia coli* MG1655. *Applied biochemistry and biotechnology* 157(2): 124-139.
- He, Y. W., Boon, C., Zhou, L. &Zhang, L. H. (2009). Co-regulation of *Xanthomonas campestris* virulence by quorum sensing and a novel two-component regulatory system RavS/RavR. *Mol Microbiol* 71(6): 1464-1476.
- He, Y. W., Ng, A. Y., Xu, M., Lin, K., Wang, L. H., Dong, Y. H. &Zhang, L. H. (2007). *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol Microbiol* 64(2): 281-292.
- He, Y. W., Wang, C., Zhou, L., Song, H., Dow, J. M. &Zhang, L. H. (2006a). Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *J Biol Chem* 281(44): 33414-33421.
- He, Y. W., Wang, C., Zhou, L., Song, H., Dow, J. M. &Zhang, L. H. (2006b). Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either

- phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *The Journal of biological chemistry* 281(44): 33414-33421.
- He, Y. W., Wu, J., Zhou, L., Yang, F., Jiang, B. L., Tang, J. L., Bai, L., Xu, Y., Deng, Z. & Zhang, L. (2011). Xanthomonas campestris diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity and systemic invasion. *Mol Plant Microbe Interact*.
- He, Y. W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y. J., Wen, C. M., Wang, L. H., Liu, Z. D., Zhang, H. B., Dong, Y. H., Dow, J. M. & Zhang, L. H. (2006c). Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in Xanthomonas campestris pv. campestris: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Molecular microbiology* 59(2): 610-622.
- He, Y. W. & Zhang, L. H. (2008). Quorum sensing and virulence regulation in Xanthomonas campestris. *FEMS Microbiol Rev* 32(5): 842-857.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7(4): 263-273.
- Hickman, J. W. & Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from Pseudomonas aeruginosa as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* 69(2): 376-389.
- Hisert, K. B., MacCoss, M., Shiloh, M. U., Darwin, K. H., Singh, S., Jones, R. A., Ehrt, S., Zhang, Z., Gaffney, B. L., Gandotra, S., Holden, D. W., Murray, D. & Nathan, C. (2005). A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of Salmonella controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* 56(5): 1234-1245.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436(7054): 1171-1175.
- Hsiao, Y. M., Liao, H. Y., Lee, M. C., Yang, T. C. & Tseng, Y. H. (2005). Clp upregulates transcription of engA gene encoding a virulence factor in Xanthomonas campestris by direct binding to the upstream tandem Clp sites. *FEBS Lett* 579(17): 3525-3533.
- Hu, N. T., Lee, P. F. & Chen, C. (1995). The type IV pre-pilin leader peptidase of Xanthomonas campestris pv. campestris is functional without conserved cysteine residues. *Mol Microbiol* 18(4): 769-777.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 379-433.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144(4): 1425-1436.
- Jansson, P. E., Kenne, L. & Lindberg, B. (1975). Structure of extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris. *Carbohydr Res* 45: 275-282.
- Jenal, U. & Fuchs, T. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *The EMBO journal* 17(19): 5658-5669.
- Jenal, U. & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* 40: 385-407.
- Jha, G., Rajeshwari, R. & Sonti, R. V. (2007). Functional interplay between two Xanthomonas oryzae pv. oryzae secretion systems in modulating virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* 20(1): 31-40.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Ahmad, I., Romeo, T., Romling, U. & Melefors, O. (2010). Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of Salmonella Typhimurium. *Environ Microbiol* 12(2): 524-540.

- Jonas, K., Edwards, A. N., Simm, R., Romeo, T., Romling, U. & Melefors, O. (2008). The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol* 70(1): 236-257.
- Jonas, K., Melefors, O. & Romling, U. (2009). Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol* 4(3): 341-358.
- Kajava, A. V. & Steven, A. C. (2006). The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J Struct Biol* 155(2): 306-315.
- Kay, S. & Bonas, U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12(1): 37-43.
- Kim, Y. K. & McCarter, L. L. (2007). ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 189(11): 4094-4107.
- Klinkenberg, L. G., Lee, J. H., Bishai, W. R. & Karakousis, P. C. (2010). The stringent response is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *J Infect Dis* 202(9): 1397-1404.
- Klumpp, S. & Krieglstein, J. (2002). Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* 269(4): 1067-1071.
- Kojima, I., Kasuga, K., Kobayashi, M., Fukasawa, A., Mizuno, S., Arisawa, A. & Akagawa, H. (2002). The *rpoZ* gene, encoding the RNA polymerase omega subunit, is required for antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. *J Bacteriol* 184(23): 6417-6423.
- Krajewska-Grynkiewicz, K. & Kustu, S. (1984). Evidence that nitrogen regulatory gene *ntnC* of *Salmonella typhimurium* is transcribed from the *glnA* promoter as well as from a separate *ntr* promoter. *Mol Gen Genet* 193(1): 135-142.
- Kuchma, S. L., Brothers, K. M., Merritt, J. H., Liberati, N. T., Ausubel, F. M. & O'Toole, G. A. (2007). BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189(22): 8165-8178.
- Laia, M. L., Moreira, L. M., Dezajacomo, J., Brigati, J. B., Ferreira, C. B., Ferro, M. I., Silva, A. C., Ferro, J. A. & Oliveira, J. C. (2009). New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. *BMC Microbiol* 9: 12.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* 67(2): 241-253.
- Lawrenz, M. B., Lenz, J. D. & Miller, V. L. (2009). A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect Immun* 77(1): 317-326.
- Leduc, J. L. & Roberts, G. P. (2009). Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* 191(22): 7121-7122.
- Lee, H. S., Gu, F., Ching, S. M., Lam, Y. & Chua, K. L. (2010). CdpA is a *Burkholderia pseudomallei* cyclic di-GMP phosphodiesterase involved in autoaggregation, flagellum synthesis, motility, biofilm formation, cell invasion, and cytotoxicity. *Infect Immun* 78(5): 1832-1840.
- Lee, M. C., Weng, S. F. & Tseng, Y. H. (2003). Flagellin gene *fliC* of *Xanthomonas campestris* is upregulated by transcription factor Clp. *Biochem Biophys Res Commun* 307(3): 647-652.
- Lee, S. W., Jeong, K. S., Han, S. W., Lee, S. E., Phee, B. K., Hahn, T. R. & Ronald, P. (2008). The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, *hrpG* expression, and virulence. *J Bacteriol* 190(6): 2183-2197.

- Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* 65(6): 1474-1484.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., Burley, S. K., Almo, S. C. & Mekalanos, J. J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(11): 4154-4159.
- Li, J. & Wang, N. (2011). The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Mol Plant Pathol* 12(4): 381-396.
- Liang, H., Zhao, Y. T., Zhang, J. Q., Wang, X. J., Fang, R. X. & Jia, Y. T. (2011). Identification and functional characterization of small non-coding RNAs in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. *BMC Genomics* 12: 87.
- Lim, S. H., So, B. H., Wang, J. C., Song, E. S., Park, Y. J., Lee, B. M. & Kang, H. W. (2008). Functional analysis of pilQ gene in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, bacterial blight pathogen of rice. *J Microbiol* 46(2): 214-220.
- Linton, K. J. & Higgins, C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* 28(1): 5-13.
- Llosa, M., Roy, C. & Dehio, C. (2009). Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol* 73(2): 141-151.
- Lory, S., Merighi, M. & Hyodo, M. (2009). Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* (53): 51-52.
- Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S. & Mekalanos, J. J. (2009). Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell host & microbe* 5(3): 234-243.
- Magnusson, L. U., Farewell, A. & Nystrom, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 13(5): 236-242.
- Marolda, C. L., Vicarioli, J. & Valvano, M. A. (2004). Wzx proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of the O-specific lipopolysaccharide subunit. *Microbiology* 150(Pt 12): 4095-4105.
- Mathew, R., Mukherjee, R., Balachandar, R. & Chatterji, D. (2006). Deletion of the rpoZ gene, encoding the omega subunit of RNA polymerase, results in pleiotropic surface-related phenotypes in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 152(Pt 6): 1741-1750.
- Mathew, R., Ramakanth, M. & Chatterji, D. (2005). Deletion of the gene rpoZ, encoding the omega subunit of RNA polymerase, in *Mycobacterium smegmatis* results in fragmentation of the beta' subunit in the enzyme assembly. *J Bacteriol* 187(18): 6565-6570.
- McCarthy, Y., Ryan, R. P., O'Donovan, K., He, Y. Q., Jiang, B. L., Feng, J. X., Tang, J. L. & Dow, J. M. (2008). The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Pathol* 9(6): 819-824.
- Meissner, A., Wild, V., Simm, R., Rohde, M., Erck, C., Bredenbruch, F., Morr, M., Romling, U. & Haussler, S. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* cupA-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate. *Environ Microbiol* 9(10): 2475-2485.
- Mercante, J., Edwards, A. N., Dubey, A. K., Babitzke, P. & Romeo, T. (2009). Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol* 392(2): 511-528.

- Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007). The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 65(4): 876-895.
- Meyer, A., Puhler, A. & Niehaus, K. (2001). The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 213(2): 214-222.
- Mijakovic, I., Poncet, S., Galinier, A., Monedero, V., Fieulaine, S., Janin, J., Nessler, S., Marquez, J. A., Scheffzek, K., Hasenbein, S., Hengstenberg, W. & Deutscher, J. (2002). Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21): 13442-13447.
- Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C. & Filloux, A. (2009). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS One* 4(6): e6018.
- Moreira, L. M., de Souza, R. F., Almeida, N. F., Jr., Setubal, J. C., Oliveira, J. C., Furlan, L. R., Ferro, J. A. & da Silva, A. C. (2004). Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 42: 163-184.
- Moreira, L. M., De Souza, R. F., Digiampietri, L. A., Da Silva, A. C. & Setubal, J. C. (2005). Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *OMICS* 9(1): 43-76.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C. K. & Chatterjee, A. K. (1996). Global regulation in *Erwinia* species by *Erwinia carotovora* rsmA, a homologue of *Escherichia coli* csrA: repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction. *Microbiology* 142 (Pt 2): 427-434.
- Murray, T. S. & Kazmierczak, B. I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol* 190(8): 2700-2708.
- Navarro, M. V., Newell, P. D., Krasteva, P. V., Chatterjee, D., Madden, D. R., O'Toole, G. A. & Sondermann, H. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol* 9(2): e1000588.
- Newman, K. L., Chatterjee, S., Ho, K. A. & Lindow, S. E. (2008). Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. *Mol Plant Microbe Interact* 21(3): 326-334.
- Newman, M. A., Daniels, M. J. & Dow, J. M. (1997). The activity of lipid A and cerne components of bacterial lipopolysaccharides in the prevention of the hypersensitive response in pepper. *Mol Plant Microbe Interact* 10(7): 926-928.
- Newman, M. A., von Roepenack, E., Daniels, M. & Dow, M. (2000). Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol* 1(1): 25-31.
- Nogueira, T. & Springer, M. (2000). Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 3(2): 154-158.
- Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., van Doorn, J., Haahtela, K., Nurmiaho-Lassila, E. L., Wengelnik, K., Bonas, U. & Korhonen, T. K. (1997). Characterization of the fimA gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 179(4): 1280-1290.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F. & Harshey, R. M. (2010). The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* 38(1): 128-139.
- Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H. & Jenal, U. (2007). Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem* 282(40): 29170-29177.

- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. & Hengge, R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 22(17): 2434-2446.
- Pitzer, J. E., Sultan, S. Z., Hayakawa, Y., Hobbs, G., Miller, M. R. & Motaleb, M. A. (2011). Analysis of the *Borrelia burgdorferi* Cyclic-di-GMP-Binding Protein PlzA Reveals a Role in Motility and Virulence. *Infect Immun* 79(5): 1815-1825.
- Poplawsky, A. R. & Chun, W. (1997). pigB determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* 179(2): 439-444.
- Poplawsky, A. R., Walters, D. M., Rouviere, P. E. & Chun, W. (2005). A gene for a dioxygenase-like protein determines the production of the DF signal in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Pathol* 6(6): 653-657.
- Potrykus, K. & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* 62: 35-51.
- Pratt, J. T., Tamayo, R., Tischler, A. D. & Camilli, A. (2007). PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 282(17): 12860-12870.
- Pukatzki, S., McAuley, S. B. & Miyata, S. T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current opinion in microbiology* 12(1): 11-17.
- Rajeshwari, R., Jha, G. & Sonti, R. V. (2005). Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact* 18(8): 830-837.
- Ray, S. K., Rajeshwari, R., Sharma, Y. & Sonti, R. V. (2002). A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. *Mol Microbiol* 46(3): 637-647.
- Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P. S., Questa, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A. & Marano, M. R. (2007). Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* 20(10): 1222-1230.
- Robertson, J. B., Gocht, M., Marahiel, M. A. & Zuber, P. (1989). AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(21): 8457-8461.
- Romling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* 57(3): 629-639.
- Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggir, Y., Benziman, M., de Vroom, E., Fidler, A., de Paus, P., Sliedregt, L. A. & et al. (1990). The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *The Journal of biological chemistry* 265(31): 18933-18943.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. & Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325(6101): 279-281.
- Rudd, K. E., Bochner, B. R., Cashel, M. & Roth, J. R. (1985). Mutations in the spoT gene of *Salmonella typhimurium*: effects on his operon expression. *Journal of bacteriology* 163(2): 534-542.
- Russel, M. (1998). Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol* 279(3): 485-499.

- Russell, R. B., Marquez, J. A., Hengstenberg, W. & Scheffzek, K. (2002). Evolutionary relationship between the bacterial HPr kinase and the ubiquitous PEP-carboxykinase: expanding the P-loop nucleotidyl transferase superfamily. *FEBS letters* 517(1-3): 1-6.
- Ryan, R. P. & Dow, J. M. (2011). Intermolecular interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence-related signal transduction in *Xanthomonas campestris*. *Virulence* 1(5): 404-408.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Crossman, L. C., Spiro, S., He, Y. W., Zhang, L. H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P. & Dow, J. M. (2006a). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(17): 6712-6717.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Jiang, B. L., He, Y. Q., Feng, J. X., Tang, J. L. & Dow, J. M. (2007). Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 63(2): 429-442.
- Ryan, R. P., Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T. & Dow, J. M. (2009). HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology* 11(5): 1126-1136.
- Ryan, R. P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M. (2010a). Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(13): 5989-5994.
- Ryan, R. P., Vorholter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J. & Dow, J. M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol* 9(5): 344-355.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Romling, U. & Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* 281(41): 30310-30314.
- Salzberg, S. L., Sommer, D. D., Schatz, M. C., Phillippy, A. M., Rabinowicz, P. D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A. L., Kelley, D., Madupu, R., Puiu, D., Radune, D., Shumway, M., Trapnell, C., Aparna, G., Jha, G., Pandey, A., Patil, P. B., Ishihara, H., Meyer, D. F., Szurek, B., Verdier, V., Koebnik, R., Dow, J. M., Ryan, R. P., Hirata, H., Tsuyumu, S., Won Lee, S., Seo, Y. S., Sriariyanum, M., Ronald, P. C., Sonti, R. V., Van Sluys, M. A., Leach, J. E., White, F. F. & Bogdanove, A. J. (2008). Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics* 9: 204.
- Sarubbi, E., Rudd, K. E., Xiao, H., Ikehara, K., Kalman, M. & Cashel, M. (1989). Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264(25): 15074-15082.
- Sato, M., Takahashi, K., Ochiai, Y., Hosaka, T., Ochi, K. & Nabeta, K. (2009). Bacterial alarmone, guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), predominantly binds the beta' subunit of plastid-encoded plastid RNA polymerase in chloroplasts. *Chembiochem* 10(7): 1227-1233.
- Schirmer, T. & Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* 7(10): 724-735.
- Schwab, S., Souza, E. M., Yates, M. G., Persuhn, D. C., Steffens, M. B., Chubatsu, L. S., Pedrosa, F. O. & Rigo, L. U. (2007). The *glnAntrBC* operon of *Herbaspirillum seropedicae* is transcribed by two oppositely regulated promoters upstream of *glnA*. *Can J Microbiol* 53(1): 100-105.
- Shen, Y. & Ronald, P. (2002). Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Microbes Infect* 4(13): 1361-1367.

- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J. M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M. A. & Parrilli, M. (2005). The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J Biol Chem* 280(39): 33660-33668.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53(4): 1123-1134.
- Simm, R., Morr, M., Remminghorst, U., Andersson, M. & Romling, U. (2009). Quantitative determination of cyclic diguanosine monophosphate concentrations in nucleotide extracts of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 386(1): 53-58.
- Skerker, J. M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S., Biondi, E. G. & Laub, M. T. (2005a). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS biology* 3(10): e334.
- Skerker, J. M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S., Biondi, E. G. & Laub, M. T. (2005b). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* 3(10): e334.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J. & Dow, J. M. (2000b). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular microbiology* 38(5): 986-1003.
- Solano, C., Garcia, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Casals, J., Pedroso, E. & Lasa, I. (2009). Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(19): 7997-8002.
- Spira, B. & Ferenci, T. (2008). Alkaline phosphatase as a reporter of sigma(S) levels and rpoS polymorphisms in different *E. coli* strains. *Archives of microbiology* 189(1): 43-47.
- Stahl, E. A. & Bishop, J. G. (2000). Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Curr Opin Plant Biol* 3(4): 299-304.
- Stephens, J. C., Artz, S. W. & Ames, B. N. (1975). Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino-acid deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(11): 4389-4393.
- Sun, L., Wu, M., Chen, H. & He, C. (2010). [Diffusible signal factor production and virulence expression in *deltarpfF*xoo, *deltarpfC*xoo and *deltarpfG*xoo, the gene deletion mutants of DSF/Rpf signaling proteins of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50(6): 717-723.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Cogez, V., Bonas, U. & Buttner, D. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol* 187(4): 983-1002.
- Tang, J. L., Feng, J. X., Li, Q. Q., Wen, H. X., Zhou, D. L., Wilson, T. J., Dow, J. M., Ma, Q. S. & Daniels, M. J. (1996). Cloning and characterization of the rpfC gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: involvement in exopolysaccharide production and virulence to rice. *Mol Plant Microbe Interact* 9(7): 664-666.
- Tang, J. L., Liu, Y. N., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C. & Daniels, M. J. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet* 226(3): 409-417.
- Tang, X., Xiao, Y. & Zhou, J. M. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19(11): 1159-1166.

- Tao, F., He, Y. W., Wu, D. H., Swarup, S. & Zhang, L. H. (2010). The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol* 192(4): 1020-1029.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter, F. J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D. & Kaiser, O. (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* 187(21): 7254-7266.
- Timmermans, J. & Van Melder, L. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67(17): 2897-2908.
- Torres, P. S., Malamud, F., Rigano, L. A., Russo, D. M., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M. & Vojnov, A. A. (2007). Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ Microbiol* 9(8): 2101-2109.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. & Setubal, J. C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC microbiology* 9 Suppl 1: S2.
- Ulrich, L. E., Koonin, E. V. & Zhulin, I. B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13(2): 52-56.
- van Doorn, J., Hollinger, T. C. & Oudega, B. (2001). Analysis of the type IV fimbrial-subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in Hyacinths. *Appl Environ Microbiol* 67(2): 598-607.
- Vergunst, A. C., van Lier, M. C., den Dulk-Ras, A., Stuve, T. A., Ouwehand, A. & Hooykaas, P. J. (2005). Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3): 832-837.
- Verniere, C. J., Gottwald, T. R. & Pruvost, O. (2003). Disease Development and Symptom Expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Various Citrus Plant Tissues. *Phytopathology* 93(7): 832-843.
- Vorholter, F. J., Niehaus, K. & Puhler, A. (2001). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core. *Mol Genet Genomics* 266(1): 79-95.
- Vorholter, F. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Ruckert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K. & Puhler, A. (2008). The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol* 134(1-2): 33-45.
- Vrentas, C. E., Gaal, T., Berkmen, M. B., Rutherford, S. T., Haugen, S. P., Vassylyev, D. G., Ross, W. & Gourse, R. L. (2008). Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *J Mol Biol* 377(2): 551-564.
- Vrentas, C. E., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R. H. & Gourse, R. L. (2005a). Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes & development* 19(19): 2378-2387.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A. & Waksman, G. (2010). Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular microbiology* 12(9): 1203-1212.

- Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X. & Zhang, L. H. (2004). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* 51(3): 903-912.
- Waters, C. M. & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 319-346.
- Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A. M., Simecka, J. W., Pruss, B. M., Babitzke, P. & Romeo, T. (2001). Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 40(1): 245-256.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25(4): 365-404.
- Wu, H. Y., Chung, P. C., Shih, H. W., Wen, S. R. & Lai, E. M. (2008). Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* 190(8): 2841-2850.
- Wu, J. & Xie, J. (2009). Magic spot: (p) ppGpp. *J Cell Physiol* 220(2): 297-302.
- Yi, X., Yamazaki, A., Biddle, E., Zeng, Q. & Yang, C. H. (2010). Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Mol Microbiol* 77(3): 787-800.
- Yun, M. H., Torres, P. S., El Oirdi, M., Rigano, L. A., Gonzalez-Lamothe, R., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Dankert, M. A., Bouarab, K. & Vojnov, A. A. (2006). Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol* 141(1): 178-187.
- Zhang, S. S., He, Y. Q., Xu, L. M., Chen, B. W., Jiang, B. L., Liao, J., Cao, J. R., Liu, D., Huang, Y. Q., Liang, X. X., Tang, D. J., Lu, G. T. & Tang, J. L. (2008). A putative colR(XC1049)-colS(XC1050) two-component signal transduction system in *Xanthomonas campestris* positively regulates hrpC and hrpE operons and is involved in virulence, the hypersensitive response and tolerance to various stresses. *Res Microbiol* 159(7-8): 569-578.
- Zhu, P. L., Zhao, S., Tang, J. L. & Feng, J. X. (2011). The rsmA-like gene rsmA(Xoo) of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* regulates bacterial virulence and production of diffusible signal factor. *Mol Plant Pathol* 12(3): 227-237.

Anexos

Curriculum vitae

MAXUEL DE OLIVEIRA ANDRADE

ENDEREÇO:

Departamento de Botânica
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo
Rua do Matão, 277
São Paulo, SP 05508-090, Brasil

Telefone do Laboratório: (11) 3091-7532 ou 7594
Celular: 8235-3160

E-mail: aomax@ib.usp.br ou maxuel_andrade@hotmail.com

FORMAÇÃO

Doutorado: Bioquímica

Depto de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – SP, Brasil. 2006 – atual.

Mestrado: Bioquímica

Depto de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – SP, Brasil. 2004 – 2006.

Graduação: Ciências Biológicas (Bioquímica e Biologia Molecular)

Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG, Brasil, 1998 – 2002.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

(02/2011 - atual) **Professor de Bioquímica**, Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, SP.
(06/2010 - atual) **Especialista em Bioquímica**, Depto Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
(08/2008 - 09/2008) **Pesquisador visitante**, Biomerit Institute, University College of Cork, Ireland.
(08/2007 - 12/2007) **Monitor PAE de Bioquímica**, Depto Bioquímica, USP, São Paulo, SP.
(02/2007 - 7/2007) **Monitor PAE de Bioquímica**, Depto Bioquímica, USP, São Paulo, SP.
(08/2006 - 12/2006) **Monitor PAE de Biologia Molecular**, Depto Bioquímica, USP, São Paulo, SP.
(02/2003 - 12/2003) **Pesquisador Assistente**, Department of Entomology, Purdue University, West Lafayette – IN, USA.
(07/2000 - 12/2002) **Iniciação científica**, Depto de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
(03/1999 - 07/2000) **Membro do Programa Especial de Treinamento (PET) da Biologia - financiado pela CAPES**, Depto de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
(02/2002 - 12/2002) **Professor de Biologia**, Gama Vestibulares, Viçosa - MG, Brasil
(03/2000 - 07/2000) **Monitor de Bioquímica**, Depto de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
(08/1999 - 12/1999) **Professor voluntário de Botânica**, Depto de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
(08/1998 - 12/1998) **Monitor Biologia celular e Molecular**, Depto de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PRÊMIOS E BOLSAS DE ESTUDO

(09/2010) **Prêmio Bio-Rad melhor trabalho de Pós-graduação na área de Genética de Microrganismos apresentado no 56^o Congresso Brasileiro de Genética**, Guarujá – São Paulo, SP.
(2006-2010) **Bolsa de doutorado**, Fundação de amparo a pesquisas do estado de São Paulo, (FAPESP, Brasil).
(2004-2006) **Bolsa de mestrado**, Fundação de amparo a pesquisas do estado de São Paulo, (FAPESP, Brasil).
(02/2003-12/2003) **Bolsa de Pesquisador visitante**, Depto de Entomologia, Purdue University, IN, USA.
(03/2002) **Prêmio Arthur Bernardes de melhor trabalho de Iniciação científica na área de Ciências biológicas**, Universidade Federal de Viçosa Viçosa- MG.
(2000-2002) **Bolsa de Iniciação científica**, CNPq, Depto de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
(1999-2000) **Bolsa Programa especial de treinamento (PET)**, CAPES, Depto de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

TRABALHOS PUBLICADOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS

9. Souza DP, Andrade MO, Alvarez-Martinez CE, Arantes GM, Farah CS, Salinas RK. 2011. **A Component of the Xanthomonadaceae Type IV Secretion System Combines a VirB7 Motif with a N0 Domain Found in Outer Membrane Transport Proteins**. PLoS Pathogens. 7(5):e1002031.
8. Ryan, R., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C.S., Armitage, J., Dow, M. 2010. **Cell-cell signal dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in Xanthomonas campestris**. PNAS.30;107(13):5989-94.
7. Guzzo, C.R., Salinas, R.k., Andrade, M.O., Farah, C.S. 2009. **PILZ Protein Structure and Interactions with PILB and the FIMX EAL Domain: Implications for Control of Type IV Pilus Biogenesis**. Journal of Molecular Biology. 6:393(4):848-66.

6. **Andrade, M.O.**, Alegria, M.C., Guzzo, C.R., Docena, C., Pereda-Rosa, M.C., Ramos, C.H.I., Farah, C.S. 2006. **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*.** *Molecular Microbiology*. v.62, p.537 – 551.
5. Rodrigues, S.M., **Andrade, M. O.**, Gomes, A.P., Damatta, F.M., Baracat-Pereira, C., Fontes, E.P.B. 2006. **Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress.** *Journal of Experimental Botany*. v.57, p.1909 - 1918.
4. Alegria, M.C., Souza, D.P., **Andrade, M.O.**, *et al.* 2005. **Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.** *Journal of Bacteriology*. 187(7). 2315-2325.
3. Festucci-Buselli, R.A., Carvalho-Dias, A.S., **Oliveira-Andrade, M.**, Caixeta-Nunes, C., Stuart, J.J., Scharf, M.E. and Pittendrigh, B.R. 2005. **Expression of *cypg6g1* and *cyp12d1* in DDT resistant susceptible strains of *Drosophila melanogaster*.** *Insect Molecular biology*. 14(1). 69-77.
2. Mariano, A.C., **Andrade, M.O.**, Santos, A.A., Carolino, S.M., Oliveira, M.L., Baracat-Pereira, M.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P. 2004. **Identification of a novel receptor- like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shutTle protein.** *Virology*. 318(1). 24-31.
1. Buzeli, R.A., Cascardo, J.C., Rodrigues, L. A., **Andrade, M.O.**, Almeida, R.S., Loureiro, M.E., Otoni, W.C. and P. B. Fontes, E.P. 2002. **Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems.** *Plant Molecular Biology*. 50(4-5):757-771.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS E SIMPÓSIOS

17. **Andrade M.O.**, Teixeira, R, Prado, F., Amaral, A., Farah C.S. The Quorum-sensing system down regulates the diGMP cyclic activating the mobility, production of exopolysaccharide and virulence factors in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. 56th National congress of genetics. Guarujá, São Paulo, SP. Genetics and Molecular Biology. Abstract GM-008. (Free communication). 2010.
16. **Andrade M.O.**, Farah C.S. **Non-polar knockouts of genes involved to motility and virulence in the phytopatogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.** XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Aguas de Lindóia, São Paulo, SP. 2009.
15. **Andrade M.O**, Alegria M.C., Farah C.S. **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*.** 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and XXXVI SBBq. Salvador, BA. 2007.
14. **Andrade M.O.**, Alegria M.C. and Farah C.S. **Characterization of protein-protein interactions important for the regulation of the quorum-sensing process in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.** XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology – SBBq F32. Águas de Lindóia, São Paulo, SP. (Free communication). 2005.
13. Rodrigues, S. M., **Andrade M. O.**, Carolino, S. M. B. and Fontes E. P. B. **Expression of the Antiquitin ortolog gene from soybean in *N. tabacum* confers tolerance to salt stress during seed germination.** XXXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG. 2003.
12. **Andrade, M. O.** and Fontes, E. P. B. **Molecular characterization of the cDNA that encoding a protein involved with water stress response and heterologous expression of the recombinant protein.** XII Meeting of Scientific Initiation of UFV. Viçosa - MG. Brasil. Abstract 155. 2002.
11. Fontenelle, M. R., **Andrade, M. O.**, Fontes, E. P. B. **Molecular characterization and heterologous expression of the TCP1 molecular chaperone homologue from soybean.** XXXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology – SBBq E17:47. Caxambu, MG. Brasil. 2002.
10. **Andrade M. O.**, Fontes E. P. B. **Isolation of soybean genes involved in the mechanism of water stress tolerance.** XXXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology – SBBq E17:47. Caxambu, MG..2002.
9. Fontenelle, M. R., **Andrade, M. O.**, Fontes, E. P. B. **Cloned and molecular characterization of the TCP1 chaperone molecular chaperone homologous from soybean.** XI Meeting of Scientific Initiation of UFV. Viçosa - MG. Brasil. *Abstract* 240. 2002.
8. **Andrade, M. O.**, Nunes, Cristiano Caixeta and Fontes, E. P. B. **Isolation of soybean genes envolved in plant water stress defese mechanism.** XI Meeting of Scientific Initiation of UFV. Viçosa - MG. Brasil. *Abstract* 248. 2002.
7. **Andrade, M. O.**, Rodrigues, L. A. Z. and Fontes, E. P. B. **Tissue-specific expression of BiP genes: The activity of BiP promoter in meristems is controlled by cis-acting domain.** XI Meeting of Scientific Initiation of UFV. Viçosa - MG. Brasil. *Abstract* 245. 2002
6. Rodrigues, L. A. Z., Buzeli, R. A. A., **Andrade M. O.**, Cascardo J. C. M., Loureiro M. E., Otoni W. C. and Fontes E. P. B. **Identification of sequence elements in plant BiP promoters involved in the ER unfolded protein response.** XXX Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology –SBBq E06:38. Caxambu, MG. Brasil.2001.
5. **Andrade M.O.**, Buzeli R. A. A., Rodrigues L. A. Z., Cascardo J.C.M., Otoni, W. C. and Fontes E. P. B. **Transcriptional activation of plant BiP under normal conditions.** XXX Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology –SBBq E08:39. Caxambu, MG. Brasil. 2001.
4. Contim , L. A. S., **Andrade, M. O.**, Loureiro , M. E., Otoni , W. C. & Fontes, E. P. B. **Sucrose binding protein gene from soybean: Promoter analysis in transgenic tobacco.** 46th National Congress of Genetics. Águas de Lindóia–SP. Brasil. Genetics and Molecular Biology. 23 (3)-supplement. Abstract GMV-002. 2000.
3. **Andrade, M. O.**, Mariano, A. C., Loureiro, M. E. & Fontes, E. P. B. **The sucrose binding protein is encoded by a small gene family in soybean.** 46th National Congress of Genetics. Águas de Lindóia-SP. Brasil. Genetics and Molecular Biology. 23 (3)-supplement. Abstract GMV-072. 2000.
2. **Andrade, Maxuel de Oliveira**, Rodrigues, Leonardo A. Z., Buzeli, R. A. A., and Fontes, E. P. B. 2000. **Analysis of the BiP Gene Promoters Expression Under Different Physiologic Stress Conditions.** X Meeting of Scientific Initiation of UFV. Viçosa - MG. Brasil. Abstract 302. 2000.
1. Rodrigues, Leonardo A. Z., **Andrade, Maxuel de Oliveira**, Buzeli, R. A. A., and Fontes, E. P. B. 2000. **Analysis of the BiP Gene Promoters Expression in Differents Organs of *Nicotiana tabacum*.** X Meeting of Scientific Initiation of UFV. Viçosa - MG. Brasil. Abstract 301. 2000.

CURSOS EXTRACURRICULARES

13. **Técnicas de separação cromatográfica: HPLC.** 2011. (Carga horária: 12h). Scientia Pharmaceutical, São Paulo, Brasil.
12. **Proteomics methods and approaches.** 2010. (Carga horária: 12h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
11. **Análise de Fluxos Metabólicos.** 2009. (Carga horária: 90h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
10. **Extensão universitária em Proteção Radiológica.** 2005. 45 h. Depto de Bioquímica, Universidade de São Paulo.
9. **DNA: Técnicas e aplicações.** Coordenador: Dr. Bayardo B. Torres. 2002. 6 h. SBBq. Caxambu- MG.
8. **Bioquímica do envelhecimento.** Coordenador Dr. Bayardo B. Torres. 2002. 6 h. SBBq. Caxambu- MG.
7. **Envolvimento da mitocôndria em processos celulares, câncer e apoptose.** Mitochondrial. 46º Congresso Nacional de Genética. 2000. 6 h. Aguas de Lindóia-SP.
6. **Controles Moleculares do desenvolvimento Vegetal.** 46º Genetic National Congress.2000. 6 h. Aguas de Lindóia-SP.
5. **Filogenia molecular em vertebrados.** Coordenador: Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos.1998. 16 h. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.
4. **Transposons em Microrganismos.** Coordenador: Prof. Dr. Marisa Vieira de Queiroz .2000. 12 h Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.
3. **Identificação de Coleopteras.** Coordenador: Prof. Dr. Ayr de Moura Bello.1999. 16 h (PROIN/CAPES) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, Brasil
2. **Ecologia do comportamento.** Coordenador: Prof. Dr. Jean-Luc Mercier.1999. 75 h. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.
1. **Genética de fungos filamentosos.** Coordenador: Prof. Dr. Elza Fernandes de Araujo.1998. 16 hours. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

SUBMISSÃO PARA GENBANK

1. **Andrade, M. O.** and Fontes, E. P. B. *Glycine max* aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 (TP55) mRNA, complete cds. Accession number: **AY250704** (1904 bp)

OBSERVAÇÕES ADICIONAIS:

1. Primeira colocação no concurso para o cargo de Especialista em Bioquímica, Depto de Botânica, Instituto de Biociências na Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. (2010).