GABRIEL UMAJI OKA

**Estudos Funcionais e Bioquímicos sobre o
Reconhecimento e Inibição de Efetores de um
Sistema de Secreção Tipo IV *Xanthomonas citri*
subsp. citri.**

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

Versão da tese corrigida

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

*São Paulo
2017*

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O41e Oka, Gabriel Umaji
Estudos funcionais e bioquímicos sobre o reconhecimento e inibição de
efetores de um sistema de secreção tipo IV *Xanthomonas citri subsp. citri* /
Gabriel Umaji Oka. -- São Paulo, 2017.
194p. + anexos.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Farah, Shaker Chuck

1. Microbiologia ambiental 2. Bioquímica I. T. II. Farah,
Shaker Chuck, orientador.

576 CDD

Agradecimentos

Agradecimentos

Ao meu orientador Shaker Chuck Farah pelo voto de confiança em me orientar ao longo de todos esses anos de projeto. Agradeço pelos diversos ensinamentos, dedicação com o projeto, pelas valiosas observações sobre o trabalho, incentivo, enorme paciência, grande ajuda, exemplo científico. Agradeço o apoio profissional e pessoal. E por ter me dado a oportunidade fantástica de ter vivenciado a ciência no seu grupo de laboratório.

Aos Professores por terem concedido as infraestruturas dos seus laboratórios, auxílio técnico e ajuda muito valiosa sempre que foi preciso; Roberto Salinas, li-sei Watanabe, Iolanda Cuccovia, Frederico Gueiros e Leandro Barbosa.

A todos que fazem parte da família Oka e Corá, pois de modo algum, eu não iria conseguir cumprir esta meta sem vocês, Beatriz; Daniel; Tia Lucia; Samuel, Patrícia, Camilinha, Camila. Ao meu Pai Oswaldo, pelo exemplo de paciência impacientemente infinita e boa vontade e bom humor em ajudar sempre. E minha mãe Olga, que não tenho como descrever todos os agradecimentos, digo que nada disso teria acontecido se não fosse por sua grande ajuda, não cabem palavras para te agradecer aqui. Mas especialmente agradeço pelas feijoadas aos sábados macarronadas de domingo, pois sem isso também não teria conseguido!

Márcia Veris, pelo grande apoio pessoal, por ter a capacidade de me fazer encontrar voz da razão em horas difíceis, pelo exemplo de perseverança, pelo grande incentivo, minha companheira, sua enorme paciência comigo ao longo de todos desses anos. Eu te amo Lindona! Agradeço a todos integrantes da família Veris, Lopes e agregados; Lucia, Edson⁺, Júnior, Alexis, Lilian, Roberto e Arturzinho. Também aos amigos de longa data, pelo apoio e incentivo, pelas festas e churrascos; Rodrigo Zenga, Clayton Balada, Paulo, Helga, e a pequena Lorena.

Luciana Coutinho de Oliveira, pelo grandessíssimo apoio e ajuda em todas as horas, ao longo das disciplinas e trabalhos desde Viçosa até aqui. Muito obrigado pela sua amizade, você é demais! Agradeço pela parceria aqui ou onde estiver!

Membros do ChuckLab e associados do lab, amigos que conheci no IQ, Profissionais e Técnicos, pela ajuda, aprendizado e convívio pessoal, boas conversas e opiniões que influenciaram positivamente muitos aspectos do projeto. German Dunger, Stefan Rakela Alexandre Bisson, Fabio Kendi, Filipe Lima, Carlos Fufu, Alfredo Duarte e Adriana Yamaguti, Sonia, Raphael Teixeira, Maycon Oliveira, Ilda Souza, Camila Schroeder, Cristina Martinez, Edgar Lhontop, German Sgro, Natalia Bueno, Marlon Moisela, Srinivas Manchalu, Santiago Areva, Tânia Geraldine, William Cenens, Ethel Santos, Bruno Matsuyama, Ronaldo Quaggio, Robson Souza e Cristiane Guzzo.

Diorge, nossa cara, também não cabem palavras para descrever sua importância neste trabalho. Sucintamente, pelas cerca de centenas de horas de boas conversas sobre um conjunto de poucas proteínas associadas ao T4SS de XAC. Também pelas outras centenas de horas restantes sobre qualquer aspecto da vida. Agradeço imensuravelmente que muitas dessas horas foram também acompanhadas de uma Brahma perfeita no Bar Reis da Batida. Pela grande amizade, companheirismo, preocupação. Pelo exemplo de postura e visão. Pela sincera opinião sempre. Pela grande colaboração e pela grande ajuda e orientação. Pelo exemplo de fazer ciência e também o slow-science que é lento, mas da vontade de quebra tudo, vai lá e faz acontecer: HARD SCIENCE, sem dia sem noite sem dormir, sem hora mesmo, experiência maluca, sangue nos olhos é Sick of it all, Hatebreed, Pantera é Sepultura é vidaloca é insano é Mad Max, é o que for, Venha! Foi uma experiência fantástica trabalhar com você ao longo desses anos.

Também ao acesso a infraestrutura da Central Analítica do Instituto de Química, LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, e agências financiadoras CNPQ, CAPES e FAPESP.

O essencial é invisível aos olhos.
Antoine Saint-Exupéry

RESUMO

Oka, G. U. **Estudos Funcionais e Bioquímicos sobre o Reconhecimento e Inibição de Efetores de um Sistema de Secreção Tipo IV de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2017.170p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sistemas de Secreção Tipo IV (T4SSs), normalmente compostos por 12 proteínas (VirB1-VirB11 e VirD4) são tipicamente associados às funções de conjugação bacteriana e transferência de fatores de patogenicidade para células hospedeiras. Mas também, muitas espécies da ordem Xanthomonadales possuem um T4SS associado a matar bactérias. O modelo atual de morte de uma célula-alvo mediada pelo T4SS é baseado na secreção de toxinas denominadas XVIPs ("*Xanthomonas VirD4 interacting proteins*") ou X-Tfe (*Xanthomonadaceae-T4SS effector*) no qual cada XVIP/X-Tfe apresenta uma proteína de imunidade cognata denominada X-Tfi (*Xanthomonadaceae-T4SS immunity protein*). Demonstramos que um XVIP, XAC2609, é secretado através do T4SS de modo que depende de contato célula-célula e do seu domínio XVIPCD ("*XVIP conserved domains*"). A porção N-terminal de XAC2609 codifica um domínio GH19 que cliva a peptideoglicana de *E. coli*, mas perde a sua atividade na presença do seu inibidor cognato, o X-Tfi XAC2610. Portanto, XAC2609/XAC2610 formam um par de proteínas efetora/imunidade associado ao T4SS de *X. citri*.

Através de diferentes técnicas de microscopias utilizando a cepa $\Delta xac2610$, foi observado que XAC2610 protege o envelope celular de *X. citri* contra efeitos de autólise celular promovidos pela atividade de XAC2609. Ensaio funcionais baseados nas observações de fenótipos de colônias e de formação de biofilme mostraram que XAC2610 confere imunidade para *X. citri* contra uma atividade

intrínseca de XAC2609.

A proteína com o papel de reconhecer os substratos através da interação com os sinais de secreção do T4SS é VirD4. No T4SS de *X. citri*, existe a hipótese de que o domínio XVIPCD seja o sinal de secreção presente nas XVIPs. Logo, os aspectos bioquímicos e biofísicos da interação VirD4-XVIPCD foram investigados através de experimentos de co-purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular, RMN e SAXS. Demonstramos que o domínio AAD de VirD4 (VirD4_{AAD}) está associado a interagir especificamente com o domínio XVIPCD de XAC2609 (XAC2609_{XVIPCD}), formando um heterodímero em solução. VirD4_{AAD} é um domínio globular e monomérico e XAC2609_{XVIPCD} é desenovelado mas se enovela concomitante à interação com VirD4_{AAD}. Construções de XAC2609 contendo mutações pontuais no domínio XVIPCD foram utilizadas em ensaios *in vivo* de secreção pela *X. citri* e ensaios *in vitro* de interação com VirD4_{AAD} por titulação monitorada por calorimetria isotérmica (ITC). Através desses experimentos, observamos que uma forte interação entre VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} é essencial para secreção de XAC2609 via o T4SS. Esses resultados permitem concluir que o domínio XVIPCD é o sinal de secreção dos substratos do T4SS de *X. citri* e que o AAD confere especificidade à VirD4 por interagir com o XVIPCD.

Finalmente, através de ensaios de competições bacterianas entre *E. coli* e *X. citri*, foram observados diferentes fenótipos associados à função do T4SS: i) nocautes gênicos das subunidades estruturais VirB5, VirB11 abolem a função do T4SS em *X. citri*.; ii) nocautes de *xac2611*, apresentaram uma maior vantagem adaptativa do que a cepa selvagem de *X. citri* em competições e a expressão episomal de XAC2611 inibe fortemente a função do T4SS e iii) a atividade ATPásica de VirD4 é essencial para a função do sistema e a expressão de mutantes

de VirD4 exerce um fenótipo de dominância negativa sobre a função do T4SS em *X. citri*.

Palavras -chave : T4SS, *Xanthomonas*, VirD4, XVIPCD, Efetor-Imunidade, Secreção

ABSTRACT

Oka, G. U. **Functional and Biochemical Studies on the Recognition and Inhibition of Effectors of a Type IV Secretion System of *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2017.170p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Type IV secretion System (T4SS) is typically associated with the function of bacterial conjugation and as a pathogenicity factor. T4SSs are normally composed of 12 proteins, VirB1-VirB11 and VirD4. Many species of the order Xanthomonadales possess a T4SS associated with killing bacteria. The current model of the T4SS killing is based on the secretion of toxins denominated XVIPs/X-Tfes (**X**anthomonas **V**irD4 interacting **p**roteins) /(**X**anthomonadaceae-T4SS **e**ffector) in which each XVIP/X-Tfe has a cognate immunity protein denominated X-Tfi (**X**anthomonadaceae-T4SS immunity protein). We demonstrate that an XVIP, XAC2609, is secreted through the T4SS so that it depends on cell-cell contact and its XVIPCD domain ("XVIP conserved domains"). The N-terminal portion of XAC2609 encodes a GH19 domain which cleaves the *E. coli* peptidoglycan but loses its activity in the presence of its cognate inhibitor, X-Tfi XAC2610. Therefore, XAC2609 /XAC2610 form a pair of effector/immunity proteins associated with *X. citri* T4SS.

By using the *X. citri* $\Delta xac2610$ strain, has been shown through different microscopic techniques that XAC2610 protects the cell envelope of *X. citri* against the effects of cellular autolysis promoted by XAC2609 activity. Functional assays based on observations of colony phenotypes and biofilm formation has shown that XAC2610 confers immunity to *X. citri* against an intrinsic activity of XAC2609.

VirD4 is the protein that recognizes the substrates through the interaction with the T4SS secretion signals. In the T4SS of *X. citri*, is hypothesized that the XVIPCD domain is the secretion signal present in the XVIPs. Here, the biochemical and biophysical aspects of the VirD4-XVIPCD interaction were investigated through Pull-

Down, Molecular Exclusion Chromatography, NMR and SAXS assays. It has been shown the AAD domain of VirD4 (VirD4_{AAD}) is associated with specifically interacting with the XAC2609_{XVIPCD} domain (XAC2609_{XVIPCD}), forming a heterodimer in solution. VirD4_{AAD} is a globular and monomeric domain while XAC2609_{XVIPCD} is elongated, but upon interaction with VirD4_{AAD} goes through structural compaction process. Constructs of XAC2609 containing point mutations in the XVIPCD domain were used to perform secretion experiments in *X. citri* and Isothermal titration calorimetry against VirD4_{AAD}. Through these assays, it has been characterized that a strong interaction between VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} is essential for secretion of XAC2609 via T4SS. Consequently, these results allow concluding that the XVIPCD domain is the secretion signal of *X. citri* T4SS substrate and the AAD confer specificity to VirD4 by interact with the XVIPCD domains.

Finally, bacterial competitions between *E. coli* and *X. citri* showed different phenotypes associated with T4SS function: i) *virB5*, *virB11* knockouts abolish the function of T4SS in *X. citri* .; ii) knockouts of *xac2611* exhibited a higher adaptive efficiency than the wild-type *X. citri* strain in competitions, but the expression of XAC2611 abolishes the function of T4SS in the wild strain of *X. citri*; iii) The ATPase activity of VirD4 is essential and exerts a negative dominance over the T4SS function in *X.citri*.

Key words: T4SS, Xanthomonas, VirD4, XVIPCD, Effector-Immunity, Secretion

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Aminoácidos

ATP – Adenosina trifosfato

CD – Dicroísmo circular

CFU – unidades formadoras de colônia

D₂O – Água deuterada

DA – Dalton

D.O.- Densidade Óptica

D.O_(600nm) - Densidade Óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético

HSQC – “Heteronuclear single quantum coherence”

IPTG – Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo

Kd – Constante de dissociação

Kda – Quilodalton

Kb – Quilopares de bases

MALDI-ToF – Dessorção de matriz assistida por laser / Tempo-de-Vôo

NM- Nanômetro

ORF – Fase aberta de leitura

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDB – “Protein Data Bank

PV – “Pathovar”

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPM – Rotações por minuto

SDS – Sódio dodecilsulfato

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

T1SS– Sistema de Secreção do Tipo I

T4SS– Sistema de Secreção do Tipo IV

T5SS– Sistema de Secreção do Tipo V

T6SS– Sistema de Secreção do Tipo VI

TBS- Tampão Tris-HCl Salina (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5)

TM – Temperatura de hibridização

Tris-HCl – Solução de tris-(hidroximetil)-aminometano, com pH ajustado pela adição de ácido clorídrico

TSP – 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetilsilil)propionato

XAC – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)

X-GAL- 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. ASPECTOS GERAIS DOS SISTEMAS DE SECREÇÃO TIPO IV	14
1.2. PROTEÍNAS ACOPLADORAS DOS T4SSs	20
1.3. SINAIS DE SECREÇÃO DO T4SS	24
1.4. SISTEMAS DE SECREÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	28
1.5. O T4SS BACTERIOLÍTICO DE <i>X. CITRI</i>	32
1.5.1. O gênero <i>Xanthomonas</i>	32
1.5.2. O locus <i>vir</i> do T4SS cromossomal de <i>X. citri</i>	32
1.5.3. Interações dos componentes dos T4SSs de <i>X. citri</i>	35
1.5.4. A estrutura e aspectos funcionais de <i>VirB7</i> de <i>X. citri</i>	38
1.5.5. O T4SS como uma nanomáquina associada a matar bactérias	40
1.5.6. Questões associadas a função do T4SS de <i>X. citri</i>	42
2. OBJETIVOS	46
2.1. OBJETIVOS GERAIS	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. METODOLOGIA	47
3.1. CLONAGEM GÊNICA E TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	47
3.1.1. Amplificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)	47
3.1.2. Clonagens de gênica em vetores <i>pET28a</i> , <i>pBRA</i> e <i>pNPTS138a</i>	50
3.1.3. Reações de Mutações sítio dirigida	55
3.1.4. Construção das cepas nocautes de <i>X. citri</i>	59
3.1.5. Produção de cepas marcadas com GFP e complementadas de <i>X. citri</i>	65
3.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HETEROLÓGAS	67
3.2.1. Expressão de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	67
3.2.2. Purificação de proteínas heterólogas	68
3.2.3. Trocas de tampão, concentração e quantificação de proteínas	71
3.3. CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E DAS INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA	72
3.3.1. Experimentos de Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos (SAXS)	72
3.3.2. Experimentos de Dicroísmo Circular (CD)	74
3.3.3. Experimentos Analíticos de Cromatografia de Exclusão Molecular	75
3.3.4. Ligação cruzada com glutaraldeído	76
3.3.5. Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	77
3.3.6. Titulação monitorada por calorimetria isotérmica (ITC)	79
3.4. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS E FUNCIONAIS DE <i>X. CITRI</i>	80
3.4.1. Cultivos celulares e curvas de crescimentos	80
3.4.2. Ensaios de competição bacteriana	81
3.4.3. Western Blot	82
3.4.4. Ensaio de secreção de XAC2609 dependente do T4SS	83
3.4.5. Ensaios de transparência de colônias e viabilidade	84
3.4.6. Ensaios de formação de biofilme bacteriano	84
3.4.7. Ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET)	85
3.4.8. Ensaios de Microscopia de Contraste de Fase e de Fluorescência	87
3.5. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	88
3.5.1. Análise de sequência da família das XVIPCDs	88
3.5.2. Análise de proteínas por bioinformática	89
4. RESULTADOS	90
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>X. CITRI</i> COM NOCAUTES NOS GENES <i>XAC2611</i> , <i>VIRB5</i> E <i>VIRB11</i>	90
4.1.1. <i>virB5</i> e <i>virB11</i> são essenciais para o funcionamento do T4SS de <i>X. citri</i>	90
4.1.2. Ensaios de competição bacteriana empregando a cepa nocaute <i>xac2611</i>	93
4.2. RECONHECIMENTO DO SUBSTRATO E SECREÇÃO DOS EFETORES VIA T4SS DE <i>X. CITRI</i>	100
4.2.1. Determinação da região codificadora de <i>VirD4_{AAD}</i>	101
4.2.2. Purificação de <i>VirD4_{AAD}</i> , <i>XAC2609XVIPCD</i> e do complexo <i>VirD4_{AAD}-XAC2609XVIPCD</i>	103
4.2.3. Ligação cruzada por glutaraldeído	108
4.2.4. Experimentos de Dicroísmo Circular	109
4.2.5. Caracterização por Cromatografia Analítica de Exclusão Molecular (SEC)	112

4.2.6. Espalhamento de Raio-X à baixos Ângulos (SAXS).....	113
4.2.7. Monitoração da interação <i>VirD4</i> _{AAD} e <i>XAC2609</i> _{XVIPCD} por RMN.....	116
4.2.8. Assinalamento parcial da cadeia principal de <i>VirD4</i> _{AAD}	119
4.2.9. Titulação por calorimetria isotérmica (ITC) e ensaios de secreção de <i>XAC2609</i>	122
4.2.10. A atividade ATPase de <i>VirD4</i> de <i>Xac</i> é essencial para a função do T4SS.....	132
4.3. CARACTERIZAÇÃO DE UM PAR DE EFETOR/INIBIDOR (<i>XAC2609/XAC2610</i>) DO T4SS DE <i>X. CITRI</i>	134
4.3.1. <i>XAC2610</i> proporciona imunidade <i>in vivo</i> contra a atividade lítica de <i>XAC2609</i>	135
4.3.2. <i>XAC2610</i> é importante para manter a integridade do envelope celular de <i>X. citri</i>	137
4.3.3. Ensaios de viabilidade celular.....	143
4.3.4. Ensaios de Biofilme.....	145
5. DISCUSSÃO	148
5.1 ASPECTOS DA INTERAÇÃO ENTRE <i>VIR</i> D4 E O DOMÍNIO <i>XVIPCD</i> DE <i>XAC2609</i>	148
5.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA DE IMUNIDADE <i>XAC2610</i>	157
5.3 OUTROS T4SSs COM ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS.....	162
5.4 OUTROS SISTEMAS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	174
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	175
6. CONCLUSÕES	176
7.REFERÊNCIAS	178
8. LISTA DE ANEXOS	194

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais dos Sistemas de Secreção Tipo IV

Bactérias utilizam os sistemas de secreção de macromoléculas para modular e interagir com o ambiente que as circundam. Em bactérias Gram-negativas, os compostos transportados por esses sistemas devem atravessar a membrana interna, o periplasma e a membrana externa para alcançar o meio extracelular ou serem secretados diretamente em uma célula-alvo.

Os Sistemas de Secreção Tipo IV (T4SS) são formados por largos complexos de proteínas e atuam na translocação de proteínas e/ou DNA para o meio extracelular. O transporte específico de substrato é dirigido por ATPases que se localizam na porção citoplasmática do complexo. Estes sistemas de transporte podem ser divididos em três grupos caracterizados por funções distintas: sistemas conjugativos, sistemas de captura ou secreção de DNA e sistemas para translocação de efetores (Alvarez-Martinez and Christie 2009). Aspectos gerais da secreção pelo T4SS estão ilustrados na Figura 1.

Figura 1. Modelo esquemático resumindo os aspectos básicos de três rotas de secreção dos substratos dos T4SSs. A) Formação do complexo relaxossomo mediado pela proteína relaxase e proteínas auxiliares. B) Relaxase ligada covalentemente ao DNA fita simples. C) Rota de secreção da relaxase ligada ao DNA, essa etapa é mediada pela proteína de acoplamento do T4SS (T4CP) D) Via de Secreção de T4SS de proteínas efetoras: Os efetores podem se ligar a chaperonas ou interagirem diretamente com as T4CPs para serem acopladas ao canal de secreção do T4SS. E) Via de secreção de DNA para o meio extracelular do T4SS GGI de *Neisseria gonorrhoeae*, as etapas de processamento do DNA são similares àquelas observadas para os sistemas conjugativos, como nos itens A e B. F) T4SS de captação de DNA extracelular (seta azul) ComB de *Helicobacter pylori*. Figura adaptada de Alvarez-Martinez & Christie 2009.

Os T4SSs conjugativos parecem ser conservados e o mecanismo de conjugação pode ser dividido em três processos (Figura 1). Primeiramente, o DNA substrato é processado por proteínas que reconhecem sequências conservadas denominadas *OriT* (Origem de Transferência), formando o complexo relaxossomo. O processamento do relaxossomo envolve quebra e desdobramento do DNA dupla fita para DNA simples fita. A enzima principal que realiza este processo é a relaxase, que se liga covalentemente à extremidade 5' da *OriT*. O segundo processo é o recrutamento do complexo DNA-relaxossomo ao canal de secreção tipo IV por Proteínas Acopladoras do T4SS (T4CPs), e então, finalmente, o complexo DNA-proteína é translocado através do canal (Alvarez-Martinez and Christie 2009; Wallden et al. 2010; Ilangovan et al. 2017).

Os T4SSs relacionados à translocação de efetores são essenciais para a virulência de diversos patógenos, como por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens*; *Legionella pneumophila*; *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Bartonella spp*, *Coxiella* e *Rickettsia spp* (Backert and Meyer 2006). O T4SS do fitopatógeno *A. tumefaciens*, denominado VirB/D4, é o paradigma para o estudo desses sistemas e é codificado pelo plasmídeo Ti. Esse plasmídeo também apresenta um sítio *oriT* adjacente a uma região denominada T-DNA (DNA de transferência) que codifica genes oncogênicos causadores da doença galha-da-coroa em plantas. A translocação de proteínas efetoras (VirE2, VirE3, VirF, VirD5) e do complexo formado pela proteína relaxase VirD2 covalentemente ligada ao T-DNA para o hospedeiro induz o crescimento de tumores em tecidos infectados, causando a doença galha-da-coroa após a recombinação do T-DNA com o DNA cromossômico do hospedeiro e expressão dos genes oncogênicos.

Devido à grande diversidade dos T4SSs, existe uma complicação atribuída à

falta de nomenclatura padrão dos seus componentes. Frequentemente, são observados genes que compartilham o mesmo nome e não são necessariamente homólogos, e genes homólogos não compartilham o mesmo nome necessariamente (Guglielmini et al. 2014). Por isso, uma prática adotada por diversos autores é atribuir uma nomenclatura dos componentes do sistema de acordo com o T4SS VirB/D4 de *A. tumefaciens*. Na Figura 2 está uma representação esquemática desse T4SS (Trokter et al. 2014), que é formado por 12 proteínas, VirB1-VirB11 e VirD4. As funções e mecanismos de cada uma dessas proteínas associadas ao transporte de substrato e de montagem do sistema de secreção ainda são poucos conhecidos. Mas trabalhos estruturais baseados em cristalografia de proteínas (Chandran et al. 2009), microscopia crio-eletrônica (Fronzes et al. 2009; Low et al. 2014; Rivera-Calzada et al. 2013) e de RMN (Bayliss et al. 2007; Souza et al. 2011; Oliveira et al. 2016) indicam que o canal de secreção do T4SS seja formado por 14 repetições do trímero VirB7-VirB9-VirB10. O canal de secreção do T4SS forma uma estrutura que atravessa a membrana interna, periplasma e membrana externa de bactérias Gram-negativas, no qual proteínas ou complexos proteína-DNA podem ser secretados (Chandran et al. 2009; Fronzes et al. 2009; Low et al. 2014). O complexo de membrana externa é formado pela lipoproteína VirB7 e as porções C-terminais de VirB10 e VirB9 (Rivera-Calzada et al. 2013; Low et al. 2014; Fronzes et al. 2009). O complexo de membrana interna é formado pelos componentes VirB3, VirB4, VirB6, VirB8 e a porção N-terminal de VirB10 (Low et al. 2014). As proteínas VirB2 e VirB5 são extracelulares, sendo que VirB2 é a subunidade que compõe o pílus, e VirB5 atua na extremidade do pílus, mediando a interação com a célula-alvo (Alvarez-Martinez and Christie 2009; Costa et al. 2016). VirB4 e VirB11 são ATPases e estão associadas à função de energizar o sistema (Trokter et al. 2014). VirD4 é uma

ATPase e atua na função de reconhecimento e acoplamento dos substratos citoplasmáticos para os componentes do canal do T4SS (Alvarez-Martinez and Christie 2009), a nomenclatura genérica dessa proteína é T4CP (*Type IV Coupling Protein*).

Figura 2. Modelo esquemático do T4SS (Troker et al. 2014). As ATPases hexaméricas VirB4 e VirD4 estabelecem contatos com as subunidades integrais do complexo de membrana interna. VirB7, VirB9 e VirB10 formam o canal de secreção que se estende a partir do IM, periplasma e membrana externa (OM). Nota-se uma região de composição não determinada (estrutura de bala cinza) e o pílus formado por VirB2 contém na sua extremidade VirB5. Flechas indicam VirB11 atuando na dinâmica de funcionamento do T4SS através de interações com VirB4 e VirD4.

Existem duas propostas de via de secreção dos substratos do T4SS: i) rota de um passo (*one step*); ii) e de dois passos (*two steps*) (Christie et al. 2014). A rota de um passo de secreção dos substratos foi estabelecida através do ensaio denominado TrIP (Transfer DNA immunoprecipitation), que é baseado na

imunoprecipitação de proteínas do T4SS covalentemente ligadas ao T-DNA ao longo de diferentes etapas da via de secreção do T4SS VirB/D4 de *A. tumefaciens*, após o tratamento com formaldeído para formar ligações cruzadas (Cascales and Christie 2004). Foi observado que o T-DNA segue uma rota de secreção cuja ordem de interação é: VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB2 e VirB9. Essa sequência de interações indica que após reconhecimento pela proteína acopladora VirD4, os substratos interagem com a ATPase VirB11. A passagem do T-DNA de VirD4 para VirB11 é dependente de um canal de secreção já estabelecido e que a ativação do T4SS é estimulada pela interação do T-DNA com VirD4 e VirB11 (Cascales and Christie 2004; Cascales et al. 2013). A translocação do T-DNA de VirB11 para o complexo de membrana (VirB6 e VirB8) interna necessita de VirB4 e também da atividade ATPase de VirB4 e VirB11 (Atmakuri et al. 2004; Cascales and Christie 2004). A partir do complexo de membrana interna, o T-DNA é direcionado para o pílus (VirB2) e para o canal de secreção formado pela VirB9-VirB10-VirB7.

A proposta de rota de dois passos de secreção é baseada na evidência de acumulação de substratos proteicos do T4SS VirB/D4 no periplasma de *A. tumefaciens* (Chen et al. 2000; Pantoja et al. 2002). Nesse modelo, assume-se que os substratos citoplasmáticos são primeiramente translocados transientemente para o periplasma e então acoplados ao canal de secreção do T4SS (Christie et al. 2014).

1.2. Proteínas acopladoras dos T4SSs

Proteínas de acoplamento (T4CP) têm o papel do recrutamento dos substratos para a maquinaria do T4SS (Cabezón et al. 1997). As T4CPs apresentam um domínio N-terminal formado por α -hélices transmembranares, um domínio de ligação a ATP (NBD) e um domínio central rico em α -hélices denominado *All-Alfa*

domain (AAD) (Gomis-Rüth et al. 2001). O fragmento solúvel de TrwB do plasmídeo conjugativo R388 é o modelo estrutural das proteínas T4CPs e foi cristalizado como um homohexâmero (Gomis-Rüth et al. 2001) (Figura 3). O hexâmero de TrwB apresenta um diâmetro de 110 Angstroms (Å) e 90 Å de altura além de um poro central com cerca de 20 Å de diâmetro (Figura 3) no qual que hipotetiza-se que ocorra a passagem dos substratos para o complexo de membrana interna do T4SS (Gomis-Rüth and Coll 2001; Tato et al. 2005; Cabezon and de la Cruz 2006).

Figura 3. Representação em fitas do modelo do homohexâmero de TrwB (Gomis-Rüth et al, 2001). Código do Protein Data Bank (PDB: 1GK1). MP membrana plasmática. Na porção esquerda, a visão lateral do hexâmero de TrwB em orientação proposta de acordo Gomis-Rüth et al, 2001.

O domínio NBD de TrwB apresenta similaridade estrutural com "*motores moleculares*" tal como F1-ATPase, FtsK, RecA e helicases, sugerindo que as T4CPs utilizem a energia de hidrólise do ATP para executar o bombeamento do DNA para o canal de secreção do T4SS (Cabezon & de la Cruz 2006; Gomis-Rüth & Coll 2001; Gomis-Rüth et al. 2001; Christie et al. 2014). O domínio AAD apresenta similaridade estrutural com o domínio N-terminal de XerD, que está associado a função de ligar e coordenar a clivagem de DNA (Gomis- Rüth et al. 2002; Cao et al. 1997; Ferreira et al. 2001) (Figura 4).

Figura 4. Similaridades estruturais de TrwB. Superposição em fitas da estrutura do TrwB (PDB 1GKI) monomérico (NBD em verde, AAD em amarelo) com: A) a porção NBD de RecA (PDB 2REB) (azul), B) Domínio N-Terminal de XerD (PDB 1A0P) (vermelho). Comparações estruturais entre TrwB-RecA e TrwB-XerD são estão descritas no trabalho de Gomis-Rüth et al. 2002.

Estudos funcionais e bioquímicos indicam que a atividade ATPásica de TrwB é essencial e mutantes exercem um efeito de dominância negativa sobre o T4SS (Moncalián et al. 1999; Tato et al. 2005; de Paz et al. 2010). Também é observada que a atividade ATPásica de TrwB é dependente da interação com DNA (Tato et al. 2005). Ensaio funcionais de conjugação bacteriana e de duplo híbrido com mutantes dirigidos de TrwB no domínio NBD indicaram que a interação homotrópica de TrwB é essencial para o funcionamento do T4SS (de Paz et al. 2010).

Por técnicas de duplo híbrido, co-imunoprecipitação e co-purificação, foi observado que as T4CPs interagem com os componentes do complexo de membrana interna do canal do T4SS (Christie and Cascales 2005; de Paz et al. 2010; Ripoll-Rozada et al. 2013; Segura et al. 2013) e com as ATPases VirB11 e VirB4 (Atmakuri et al. 2004; Christie and Cascales 2005; Schröder and Lanka 2005; Ripoll-Rozada et al. 2013).

Alguns exemplos de interações entre T4CPs e substratos do T4SS são: TraD-TraM (T4CP-relaxase) do plasmídeo F (Disque and Dreiseikelmann 1997); TraG-TraI (T4CP-relaxase), (Schröder et al. 2002); PcfC-PcfF (T4CP-proteína acessória) e PcfC-PcfG (T4CP-relaxase) (Chen et al. 2008); VirD4-VirD2 (T4CP-relaxase) (Cascales and Christie 2004) e TrwB-TrwC (T4CP-relaxase) (Llosa et al. 2003). Nota-se também que algumas T4CPs podem substituir umas às outras, tal como exemplificado pela secreção do plasmídeo RSF010 pelos T4SSs codificados pelos plasmídeos R388, RPF e pTIC58 (Alvarez-Martinez and Christie 2009). A estrutura cristalográfica do complexo formado entre a T4CP TraD com a proteína auxiliar do relaxossomo TraM mostra que os últimos sete resíduos de TraD se encaixam na fenda positivamente carregada de TraM (Lu et al. 2008).

Ensaio de copurificação por cromatografia de afinidade indicaram uma interação específica entre o domínio AAD do VirD4 (VirD4_{AAD}) com VirD2 de *A. tumefaciens* e de PcfC_{AAD} com PcfF e PcfG de *E. faecalis*. A expressão episomal por meio de plasmídeos codificando os domínios AADs em *A. tumefaciens* e *E. faecalis* exercem um efeito de dominância negativa de modo específico sobre o funcionamento dos T4SSs cognatos. Os autores sugerem que esse fenômeno ocorre devido ao sequestro dos substratos pelo VirD_{AAD} (Whitaker et al. 2015). Por outro lado, VirD4_{AAD} e PcfC_{AAD} interagem com DNA fita simples e fita dupla independentemente de uma sequência específica. Portanto, assume-se que o domínio AAD das T4CPs esteja relacionado à função de reconhecimento dos substratos proteicos dos T4SSs associados à secreção de efetores e complexos Relaxases-DNA.

1.3. Sinais de Secreção do T4SS

Diferentes estudos indicam que a porção C-terminal nos substratos dos T4SSs de proteínas efetoras funcionam como sinal de secreção para esses sistemas. Foi observado que as características físico-químicas de carga e hidrofobicidade nas cadeias laterais dos aminoácidos que compõem esses sinais são importantes para o processo de translocação pelo T4SS. Diversos substratos do T4SS VirB/D4 de *A. tumefaciens* apresentam sinais de secreção C-terminais positivamente carregados (Vergunst et al. 2005). Os últimos 20 resíduos do efetor RalF do T4SS Icm/Dot de *L. pneumophila* foram caracterizados como essenciais e suficientes para secreção. Nota-se que a presença de resíduos hidrofóbicos é uma característica conservada em diferentes efetores desse sistema (Nagai et al. 2005). As porções C-terminais dos substratos VceC e VceA do T4SS VirB de *Brucella spp* contêm resíduos hidrofóbicos e positivamente carregados. Também, nota-se que os últimos 115 resíduos de VceC foram suficientes para translocação através do T4SS Dot/Icm de *L. pneumophila* (De Jong et al. 2008). Proteínas Ank(A-P) foram descritas como substratos do T4SS Dot/Icm de *Coxiella burnetti*. Para AnkI, foi observado que os 82 últimos resíduos foram suficientes e os 10 últimos resíduos de caráter hidrofóbicos são requeridos para secreção através do T4SS Dot/Icm em *L. pneumophila* (Voth et al. 2009).

O T4SS VirB/D4 de *Bartonella henselae* tem como substrato uma família de efetores denominadas Beps (A-G). As Beps apresentam uma arquitetura modular, na qual a porção N-terminal é composta por diferentes domínios efetores seguida do sinal de secreção. Os sinais de secreção das Beps são formados por pelo menos uma cópia de um domínio *BID* (*Bep intracellular delivery*) seguido de um trecho positivamente carregado na extrema porção C-terminal (Schulein et al. 2005). As

estruturas cristalográficas de três domínios BIDs apresentaram um dobramento proteico formado por quatro α -hélices antiparalelas e um gancho na porção apical do domínio formado por duas curtas folhas β pregueadas (Stanger et al. 2016).

Sinais de secreção codificados ao longo da cadeia polipeptídica dos substratos secretados pelos T4SS conjugativos foram caracterizados para alguns T4SSs. A partir de estudos estruturais e funcionais, foram descobertos motivos conservados denominados TS (Sinal de translocação), cuja a sequência consenso é formada por sete resíduos (G[E/D]R[L/M]R[V/F]T) localizados nas superfícies de grandes domínios estruturais presentes nas relaxases da família Mob, Tral e TrwC e que são considerados sinais de secreção específicos em T4SSs conjugativos (Lang et al. 2010; Alperi et al. 2013).

Exemplos de relaxases que podem ser secretadas tanto por T4SS conjugativos quanto por T4SS que secretam somente efetores proteicos estão auxiliando a compreender aspectos básicos do recrutamento pelos T4SS. Nota-se que a presença de diferentes sinais de secreção confere a especificidade para cada um desses tipos de sistemas (Lang et al. 2010; Alperi et al. 2013). A relaxase TraA codificada pelo plasmídeo conjugativo pATC58 *A. tumefaciens* é também transferida eficientemente pelo T4SS VirB/D4 de *B. henselae* de modo dependente de um domínio BID naturalmente presente nessa proteína (Schulein et al. 2005). A relaxase MobA apresenta dois tipos de sinais de secreção ao longo de sua cadeia polipeptídica: i) os sinais de secreção sg1 e sg2, que são importantes para translocação em sistemas conjugativos (Parker and Meyer 2007); ii) e a porção extremo C-terminal positivamente carregada, que é essencial para translocação pelo T4SS VirB de *A. tumefaciens* (Vergunst et al. 2005). A relaxase TrwC é translocada pelo seu T4SS cognato codificado pelo plasmídeo R388 (Draper et al. 2005) de

modo dependente dos sinais de secreção conjugativos (Alperi et al. 2013) e também pode ser translocada naturalmente para células eucarióticas via o T4SS VirB/D4 de *B. henselae* (Fernández-González et al. 2011), apesar de não codificar nenhum domínio BID aparente ao longo de sua sequência. Alterações na porção C-terminal de TrwC modularam principalmente aspectos funcionais da secreção no T4SS efetor VirB/D4 de *B. henselae* e alterações nos sinais de secreção TS1 e TS2 afetaram principalmente os processos de conjugação (Alperi et al. 2013).

Para caracterizar os sinais de secreção dos efetores do T4SS VirB/D4 de *A. tumefaciens* foi utilizado o ensaio de *Cre-recombinase* (Vergunst et al. 2005). Esse ensaio é baseado na construção de proteínas quimeras que codificam na sua porção N-terminal a recombinase Cre do bacteriófago P1, e na porção C-terminal os domínios e/ou regiões dos substratos Vir essenciais para secreção via T4SS. A translocação das proteínas quimeras a partir de *A. tumefaciens* para células eucarióticas são monitoradas pela expressão da proteína fluorescente GFP que ocorre após a recombinação nos sítios *lox* nas células transfectadas de *Arabidopsis thaliana*. Essa metodologia também foi empregada para determinar os sinais de secreção dos efetores Beps do T4SS VirB/D4 de *B. henselae* e da relaxase TrwC (Alperi et al. 2013) em ensaios de secreção de bactérias para células endoteliais humanas (Schulein et al. 2005).

As regiões essenciais para a secreção nos efetores que são translocados através do T4SS Icm/Dot de *L. pneumophila* também foram determinadas com o uso de proteínas quimeras contendo na sua porção N-terminal uma enzima de atividade repórter e na porção C-terminal os sinais de secreção analisados. A enzima Adenilato ciclase de *Bordetella pertussis* foi utilizada para determinar as regiões mínimas necessárias para secreção de RalF (Nagai et al. 2005) e de Ankl (Voth et

al. 2009). Também, fusões gênicas N-Terminais que codificavam a enzima TEM1 β -lactamase com as porções C-terminais de RalF, VceA e VceC (De Jong et al. 2008) foram capazes de mostrar a translocação dos substratos via o T4SS de Icm/Dot para células eucarióticas.

Figura 5 apresenta um sumário dos sinais de secreção dos T4SSs caracterizados experimentalmente descritos nesse capítulo, incluindo o sinal de secreção do T4SS de *X. citri* que será descrito em maiores detalhe nos próximos tópicos dessa tese.

	Sinais de Secreção	Sequência primária extremo C-terminal	T4SS - Organismo	Técnicas utilizadas para detecção do sinal de secreção	Referências
Efetores		Xac2609 EESQRCAIQVQTOESASRSMS	VirB/D - <i>X. citri</i>	Duplo Híbrido Imunodeteção de Xac2609	Alegria et al. 2005 Souza et al. 2015
		VirE2 ISDSRRTYESRPGPTVNSL			
		VirD2 SERKREDESKDGGGNNR	VirB/D - <i>A. tumefaciens</i>	Fusão N-terminal Cre-recombinase	Vergunst et al. 2005
		VirF HDDARAEIAMSADRPSTUGL			
		VirE3 SPPTSAASMIFFEGSRPEESTSGF			
		VceC AALQTTAFALDVALIRALGGGFS	VirB - <i>Brucella</i> spp.	Fusão N-terminal β -lactamase	De Jong et al. 2008
		VceA GRIIRAGMSVLVLDITRTPQGNSL			
		CagA RENAEGHGINVNTGGFORS	<i>Cag</i> - <i>H. pylori</i>	Fusão N-terminal GSK tag	Hohlfeld et al. 2006
		BepA HQQSPEVPPRTVGGAIAFAI	VirB/D - <i>Bartonella henselae</i>	Fusão N-terminal de Cre-recombinase	Schulein et al. 2005
		BepD QETORQSPPTQIGRAFAI			
Relaxases		RalF EGGVPEIDDAEMQEEHCHOLF	<i>Icm/Dot</i> - <i>L. pneumophila</i>	Fusão N-terminal de adenilato ciclase	Nagai et al. 2005
		AnKI LLEQLTMDSSITLESFF	<i>Icm/Dot</i> - <i>Coxiella burnetii</i>	Fusão N-terminal de adenilato ciclase	Voth et al. 2009
		MobA RAELARAPAPROGMDGGPDEFM	pRSF1010 <i>A. tumefaciens</i>	Fusão N-terminal de Cre-recombinase	Parker & Meyer 2007
		TrwC QPAHDQIAAEAEAGMEAGR	pR388 <i>E. coli</i>	Fusão N-terminal de Cre-recombinase	Vergunst et al. 2005
		TraA RTVQSLKQAEELQTLQAPVLKQ	pATC58 <i>A. tumefaciens</i>	Eficiência de conjugação e transfecção	Alperi et al. 2013
				Fusão N-terminal de Cre-recombinase	Schulein et al. 2005

Extremo C-terminal positivamente carregado

N-terminal e C-terminal de CagA

Sinal de Secreção conjugativo

Extremo C-terminal hidrofóbico

Domínio BID

Domínio XVIPCD

Figura 5. Modelo esquemático dos substratos e sinais de secreção dos T4SSs. Substratos dos T4SS efetores e conjugativos (relaxases) estão notados na porção esquerda da Figura. Modelo representativo das proteínas efetoras em forma de retângulos indicando os sinais de secreção caracterizados experimentalmente nos T4SSs indicados de acordo com a legenda. Sequência primária da porção extremo C-terminal dos substratos, em vermelho estão resíduos e sinais de secreção carregados positivamente, em azul resíduos e sinais de secreção hidrofóbicos. O T4SS cognato das proteínas efetoras e relaxases estão indicados por chaves. As técnicas experimentais utilizadas para a determinação dos sinais de secreção para cada substrato estão anotadas na mesma linha do T4SS cognato e à esquerda da sua referência

1.4. Sistemas de secreção de bactérias Gram-negativas com atividade antibacteriana

Até a presente data, em bactérias Gram-negativas, os sistemas de secreção caracterizados por apresentarem atividade antibacteriana são: o sistema de bacteriocinas, sistema CDI, sistema CDZ, T6SS e o T4SS de *X. citri* que será descrito nos próximos subtópicos desta tese. Esses sistemas podem causar a morte de uma célula-alvo por dois modos distintos: morte dependente de contato e morte independente de contato.

Bacteriocinas

Bacteriocinas são proteínas efetoras secretadas no meio extracelular que atuam inibindo o crescimento de espécies bacterianas proximamente relacionadas à célula secretora. São amplamente espalhadas entre as bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e *archaeas*, e são diversas em termos de estrutura, sequência de aminoácidos e atividade. Comumente são descritas bacteriocinas com atividade de DNase, RNase e formação de poros de membrana. As bacteriocinas em geral são co-produzidas com suas proteínas de imunidades cognatas e a secreção é mediada por uma proteína de lise que induz um processo de autólise para liberar as toxinas para o meio extracelular, um evento letal também para a bactéria produtora. Após liberadas no meio extracelular, as toxinas interagem com receptores de membrana para iniciar o processo toxicidade na célula-alvo. Assume-se que a especificidade de interação entre as bacteriocinas com os receptores conferem um baixo espectro de atividade antibacteriana para esse sistema (Benz and Meinhart 2014).

Sistema CDI

O sistema de Inibição de crescimento Dependente de Contato (CDI) faz parte de um subgrupo da família dos T5SSs e estão distribuídos em diferentes

espécies de bactérias Gram-negativas. Em *E. coli*, este sistema é codificado pelo *locus cdiBAI*, sendo CdiA a proteína efetora, CdiB a proteína associada à formação do canal de membrana externa, e CdiI a proteína de imunidade que inibe autointoxicação por meio de sua interação com o domínio C-terminal de CdiA (Aoki et al. 2005). A via de secreção na célula produtora de CdiA para o meio extracelular depende primeiramente do sistema Sec, no qual CdiA é translocada do citoplasma para o periplasma celular e subsequentemente transportada para fora da célula através do canal de membrana externa formado por CdiB. Ancorada na superfície da célula doadora através de interações com canal de membrana formado por CdiB, CdiA interage com receptores presentes na membrana externa da célula-alvo para ser translocada para o periplasma e subsequentemente para o espaço citoplasmático. Logo, observa-se que a atividade antibacteriana do sistema CDI é determinada pela interação entre domínios específicos de CdiA e os receptores de membrana externa e interna da célula-alvo (Danka et al. 2017). A porção C-terminal de CdiA codifica domínios tóxicos associados a atividade de nuclease, desaminase, ADP-ribosiltransferase, peptidase e fosfolipases associadas à formação de poros de membrana (Benz and Meinhart 2014).

Sistema CDZ

Recentemente descrito, o sistema de inibição dependente de contato mediado por proteínas zippers (CDZ) faz parte de um subgrupo da família dos T1SSs e estão distribuídos em diferentes espécies de bactérias Gram-negativas (García-Bayona et al. 2017). Em *Caulobacter crescentus*, este sistema é codificado pelo *locus cdzABCDI*. CdzA e CdzB são proteínas homólogas aos componentes do T1SS, respectivamente, ao transportador ABC de membrana interna e à proteína adaptadora periplasmática MFP. CdzC e CdzD são proteínas efetoras e apresentam

um motivo *ziper* de glicina ao longo de sua sequência e CdZl é predita conferir imunidade contra efeitos de auto-intoxicação promovidos por CdZC e CdZD. CdZC e CdZD se localizam na membrana externa das células produtoras e estão associadas a serem formadores de poros de membrana nas células alvos (García-Bayona et al. 2017). Em *C. crescentus* foi observado que a atividade antibacteriana do sistema de CdZ é direcionada principalmente contra cepas mutantes de *C. crescentus* deficientes de CdZl e espécies de bactérias da família de *Caulobacteraceae*.

Sistema de Secreção Tipo 6 (T6SS)

Os T6SSs são amplamente distribuídos em espécies de bactérias Gram-negativas e seus componentes são ancestralmente relacionados com a maquinaria de injeção de fagos contráteis ("T-even phages") (Leiman et al. 2009). Assim como o T4SS, são observados diferentes tipos de T6SSs que secretam seus efetores, em um modo dependente de contato celular, em células eucarióticas (Pukatzki et al. 2006) e procarióticas (Hood et al. 2010). Em um estudo utilizando a bactéria *Burkholderia thailandensis* que apresenta seis diferentes *locus* gênicos de T6SS espalhados ao longo de seu genoma, foi identificado que o T6SS-5 é especificamente associado em causar a virulência em células eucarióticas e o T6SS-1 é especificamente associado a atividade antibacteriana. Foi observado que o T6SS-1 de *B. thailandensis* e inibe o crescimento de diferentes espécies de γ -Proteobactérias e β -Proteobactérias (Schwarz et al. 2010).

Uma das características mais marcantes dos T6SSs está associada ao fenômeno de secreção, que ocorre pela perfuração da célula-alvo, devido a inserção de um tubo proteico formado pelas proteínas Hcp, VgrG e PAAR. A Hcp é o principal componente do tubo, e as proteínas VgrGs e PAARs formam uma estrutura perfurante localizada na extremidade distal do tubo Hcp (Basler et al. 2012). São

observadas diversas vias de recrutamento dos efetores para o T6SS. Os efetores podem ser acoplados na parte interna do canal Hcp, podem interagir especificamente com as proteínas VgrG para serem translocados até a célula-alvo ou também podem fazer parte da própria cadeia polipeptídica dos componentes estruturais Hcp, PARR ou VgrG (Ho et al. 2014; Cianfanelli et al. 2016).

Em bactérias β - γ - e δ - Proteobactérias, foram identificados diversos efetores do T6SS preditos a clivar ligações glicosídicas e diferentes ligações peptídicas da peptidoglicana bacteriana (Russell et al. 2011, 2012). Também é descrita a existência de uma superfamília de enzimas efetoras dos T6SSs antibacterianos com atividade de fosfolipase presentes em diversas bactérias Gram-negativas, incluindo algumas espécies de *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas* (Russell et al. 2013). Finalmente, em *A. tumefaciens* foi descrito uma família de DNases secretadas pelo T6SS que conferem atividade antibacteriana (Ma et al. 2014).

Um aspecto conservado dos T6SSs antibacterianos é a presença de proteínas de imunidade que geralmente são co-transcritas com as proteínas efetoras (Russell et al. 2011). Geralmente, o gene que codifica a proteína de imunidade se encontra no lado 3' (*downstream*) do gene que codifica o efector. Outro aspecto conservado é que as proteínas de imunidade associadas a proteger a membrana plasmática e a parede celular são preditas a se localizarem no periplasma da célula doadora (Russell et al. 2011, 2013). Assume-se que a localização periplasmática das proteínas de imunidade seja importante para impedir um efeito de fratricídio celular devido à secreção de efetores de uma célula para outra (Russell et al. 2014).

1.5. O T4SS bacteriolítico de *X. citri*

1.5.1 O gênero *Xanthomonas*

Xanthomonas é um grande gênero de bactérias Gram-negativas e que pertence à subdivisão das γ -Proteobactérias, sendo constituídas por inúmeras espécies que coletivamente causam doenças em cerca de centenas de tipos de cultivares diferentes, com a característica de que cada linhagem de *Xanthomonas* apresenta uma faixa muito restrita de hospedeiros. Geralmente apresentam forma de bacilo e coloração de colônia amarela devido à produção do pigmento de membrana, denominado xantomonadina. São aeróbios obrigatórios e crescem em uma temperatura ótima de 25-30 °C (Bergey et al. 1984; Büttner and Bonas 2010; Ryan et al. 2011).

O genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* linhagem 306, atualmente reclassificado como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) é o agente causador da doença do cancro cítrico e possui um cromossomo circular de aproximadamente 5,2 milhões de pares de bases e dois plasmídeos, pXAC33 e pXAC64, apresentando mais de 4300 ORFs (*Open Reading Frames*, ou Fases Abertas de Leitura) (da Silva et al. 2002).

1.5.2 O locus *vir* do T4SS cromossomal de *X. citri*

Em *X. citri*, além dos *lóci* dos Sistemas de Secreção Tipo I, II, III, V e VI foram anotados dois clusters de genes codificantes de diferentes T4SSs (da Silva et al. 2002; Büttner and Bonas 2010). Um no plasmídeo pXAC64 que codifica um T4SS tal como observado nos plasmídeos conjugativos pWW0 de *Pseudomonas putida* (Greated et al. 2002; Alegria et al. 2005), pXcB *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (El Yacoubi et al. 2007) e um outro cromossomal que aparentemente era

ausente dos componentes VirB7 e VirB5 (da Silva et al. 2002). Existe um terceiro T4SS, ainda não caracterizado, entre genes *xac2253-xac2284* no genoma de *X. citri*.

A disposição dos genes no *operon* do T4SS cromossomal de *X. citri* é similar ao que é observado nos T4SS paradigmáticos VirB/D4 de *A. tumefaciens* e do plasmídeo IncW R388 de *E. coli* e em outros organismos (Low et al. 2014) (Figura 6). Visto isso, a localização do gene *xac2613*, que é candidato a codificar *virB5* em *X. citri*, é localizado entre os *loci* de *virB4* e *virB6*, assim como *viB5* dos T4SSs VirB/D4 e R388 (IncW) (Figura 6) (Alegria et al. 2005). VirB5 é caracterizada por apresentar um peptídeo sinal N-terminal seguido de um domínio globular com um alto conteúdo α -hélices, e apresentar cerca de 220 resíduos de extensão com um ponto isoelétrico teórico em torno de ~5 (Yeo et al. 2003). Além disso, VirB5 é predita a se localizar na extremidade do pílus do T4SS e atuar na função de reconhecimento da célula receptora. Devido a isso, observa-se um baixo grau de conservação de sequência nas proteínas que constituem essa família (Backert et al. 2008). Nota-se que as predições de PI, de estrutura secundária de XAC2613 descritas na Tese do Dr. Diorge Paulo de Souza indicam que XAC2613 seja de fato uma VirB5 em *X. citri*. Isso também foi predito em Alegria et al. 2005.

Figura 6. Organização do operon do T4SS cromossomal de *X. citri*, VirB/D4 de *A. tumefaciens* e do plasmídeo R388 (IncW) de *E. coli*. Figura modificada de Low et al. 2014 pela adição do locus *vir* do T4SS de *X. citri*, incluindo os genes *xac2609*, *xac2610* e *xac2611*.

Na Tabela 1 estão notados os tamanhos da cadeia polipeptídica dos componentes dos T4SSs codificados pelo cromossomo de *X. citri*, VirB/D4 do plasmídeo TI de *A. tumefaciens* e plasmídeo R388 (IncW) de *E. coli*. São observadas diferenças de tamanhos entre os componentes do T4SS de *X. citri* e os componentes do T4SSs de *E. coli* e *A. tumefaciens*. A característica mais notável é relativa ao tamanho de VirB7 de *X. citri*, que é cerca de 3x maior do que as VirB7 canônicas e que atualmente sabemos ser essencial para o funcionamento do T4SS. Os aspectos funcionais de VirB7 serão descritas nos próximos tópicos dessa Tese e também foram detalhadamente descritos ao longo da Tese de Doutorado de Diorge Paulo de Souza (Souza 2010) e nos trabalhos publicados (Alegria et al. 2005; Souza et al. 2011, 2015; Oliveira et al. 2016).

Contudo, a comparação de sequência dos outros componentes do T4SS (VirB1-11 (-VirB7) e ViD4) mostram um grau de variação de identidade de sequência em torno de 16% a 39% de identidade. Apesar de consideramos que existe uma variação intrínseca em termos de conservação de sequência para cada componente, como exemplo VirB4 que é o maior e mais conservado componente dos T4SSs (Durand et al. 2011), as análises individuais das proteínas Vir que constituem o T4SS de *X. citri* apresentam um grau de proximidade com os T4SS paradigmáticos VirB/D4 de *A. tumefaciens* e do plasmídeo R388 (IncW) de *E. coli*. Interessantemente, nota-se que as proteínas VirB(1-11) com exceção de VirB7 do T4SS cromossomal de *X. citri* são proximamente relacionadas aos componentes dos T4SSs conjugativos (Tabela 1). Por outro lado, VirD4 de *X. citri* é mais similar a VirD4 de sistemas efetores tal como no T4SS de *A. tumefaciens* (Tabela 1). Outra significativa diferença é no VirB8 de *X. citri* que tem uma extensão de 100 aa rica em glutaminas na região C-terminal. Outro ponto a ser ressaltado é que um grande

número de componentes do T4SS de *X. citri* tem um resíduo básico bem perto do seu C-terminal - muito similar ao que é observado com os XVIPS. Apesar de não ter chegado a nenhuma explicação plausível, é um fato curioso.

Tabela 1. Tamanho dos componentes do T4SS e comparação de identidade de sequência entre os componentes do T4SS cromossomal de *X. citri*, VirB/D4 de *A. tumefaciens* e IncW de R388 de *E. coli*. Porcentagem de identidade de sequência (% id)

Componentes dos T4SSs (Vir/Trw)	Número de aminoácidos (aa)			% id T4SS <i>X. citri</i> vs <i>A. tumefaciens</i>	% id T4SS <i>X. citri</i> vs IncW R388	% id T4SS IncW R388 vs <i>A. tumefaciens</i>
	<i>X. citri</i>	<i>A. tumefaciens</i> (VirB/D)	IncW R388			
VirB1/TrwN	280aa	245aa	198aa	24.17%	36.41%	34.52%
VirB2/TrwL	136aa	121aa	112aa	21.82%	25.24%	18.37%
VirB3/TrwM	103aa	108aa	102aa	21.57%	30.93%	23.76%
VirB4/TrwK	817aa	789aa	823aa	32.99%	39.85%	32.08%
VirB5/TrwJ	275aa	220aa	226aa	20.0%	19.51%	30.00%
VirB6/TrwI	350aa	295aa	342aa	16.6%	25.64%	22.05%
VirB7/TrwH	139aa	55aa	44aa	--	--	28.21%
VirB8/TrwG	348aa	237aa	231aa	22.65%	27.23%	24.77%
VirB9/TrwF	255aa	293aa	266aa	21.58%	26.84%	30.80%
VirB10/TrwE	389aa	377aa	395aa	27.41%	31.09%	35.93%
VirB11/TrwD	346aa	344aa	358aa	34.05%	39.22%	34.37%
VirD4/TrwB	557aa	668aa	507aa	30.90%	22.17%	21.31%
Média	-	-	-	24.8%	29.4%	28.26%

As porcentagens (%) de identidade de alinhamento de sequências foram obtidas com o uso do software T-coffee (Notredame et al. 2000). Com exceção de VirB7 de *X. citri* visto a grande disparidade de tamanho entre os componentes canônicos. Média representa a média aritmética das identidades de sequências observadas ao longo das linhas.

1.5.3 Interações dos componentes dos T4SSs de *X. citri*

No trabalho de tese desenvolvido pelo aluno de Doutorado Marcos Castanheira Alegria (Alegria et al. 2005), foram investigadas as interações entre os componentes proteicos do T4SS de *X. citri* pela técnica de duplo híbrido. Nesse trabalho foram observadas as interações anteriormente caracterizadas em diferentes T4SSs, como as interações entre VirB11-VirB11 e também de XAC2622-VirB9, (VirB7-VirB9) (Figura 7A). A interação entre XAC2622-VirB9 foi a primeira evidência experimental indicando um aspecto funcional de uma VirB7 cerca de 3x maior tamanho em relação a outras VirB7. Notavelmente, dentro do *locus vir* do T4SS de *X. citri*, foi observada uma rede de interações formada pelas ATPases

citoplasmáticas VirD4 e VirB11 com, respectivamente, as proteínas hipotéticas XAC2609 e XAC2610 que também interagem entre si (Figura 7A). Adicionalmente, utilizando VirD4 como *isca*, foi observado um conjunto de interações com doze proteínas hipotéticas, incluindo XAC2609 (Figura 7B). Essas proteínas foram denominadas XVIPs ("*Xanthomonas VirD4 interacting proteins*") e em comum apresentam um domínio conservado na porção C-terminal que foi denominado XVIPCD ("*XVIP conserved domains*") (Figura 7 B-C). O domínio XVIPCD apresenta cerca de 120 resíduos de extensão e apresenta regiões cujas sequências são mais conservadas (GLxRIDHV e FAVQGxxDPAHxRAHV) e um trecho rico em glutaminas na porção extremo C-terminal (Alegria et al. 2005).

Portanto, naquela época foi descoberta uma rede de interações no *locus vir* cromossomal do T4SS indicando uma possível funcionalidade do sistema: VirD4, que é a proteína acopladora do T4SS, mostrou interagir com a proteína XVIP XAC2609, que interage com uma lipoproteína hipotética XAC2610, que é predita a se localizar no periplasma e, por sua vez, também interage com VirB11.

1.5.4 A estrutura e aspectos funcionais de VirB7 de *X. citri*

Dada à evidência de *X. citri* produzir uma proteína VirB7 funcional a partir das interações observadas nos ensaios de duplo híbrido, no trabalho de Tese de Diorge Paulo de Souza (Souza 2010; Souza et al. 2011), foram investigados os aspectos estruturais e funcionais de XAC2622 de *X. citri*. Ao longo desse trabalho foi determinada a estrutura cristalográfica e de RMN de VirB7 de *X. citri*. A VirB7 de *X. citri* possui um domínio globular N0 na sua porção C-terminal (Figura 8A) ausente na maioria dos outros T4SS (Figura 8B) (Souza et al. 2011). O domínio N0 presente em VirB7 está envolvido em interações homotrópicas possivelmente relacionadas à polimerização, coordenando a formação do complexo VirB7-VirB9-VirB10 de *X. citri* (Figura 8C). Foi observado que a porção N-terminal de VirB7 é desenovelada *in vitro* e que o trecho que compreende os resíduos 27 a 41 de VirB7 interage com a porção C-terminal de VirB9. Ao longo desse trecho desenovelado, foi observado que os resíduos 42 a 49 interagem com o domínio N0, assim mediando a polimerização de VirB7. Essas observações permitiram construir um modelo computacional para o complexo VirB10_{CT}-VirB9_{CT}-VirB7. Este modelo sugere que o poro da membrana externa do T4SS de *X. citri* pode possuir um anel extra no seu perímetro composto pelo domínio N0 de VirB7 (Figura 8C) (Souza et al. 2011). A partir disto, surgia a evidência que T4SS de *X. citri* poderia apresentar tanto diferenças estruturais quanto funcionais quando comparado com outros T4SSs já estudados.

Figura 8.. Estrutura da VirB7_{XAC2622} e suas interações no complexo VirB7-VirB9-VirB10 do poro do T4SS da membrana externa. **A)** Organização da proteína VirB7_{XAC2622}. **B)** Estrutura do complexo da membrana externa TraN-TraO_{CT}-TraF_{CT} do plasmídeo pKM101 de *E. coli*. TraN: ciano, TraO_{CT}: vermelho, TraF_{CT}: amarelo. **C)** Modelo do complexo VirB7_{XAC2622}-VirB9_{XAC2620}-VirB10_{XAC2619} de *X. citri* baseado na estrutura de Tra/N/O/F. VirB10: amarelo, VirB9: vermelho, VirB7: ciano (uma molécula mostrada em verde). Figura adaptada de Souza et al, 2011.

Há evidências de que o T4SS de *X. citri* é montado *in vivo*, que são: i) as estabilidades de VirB9 e VirB10 *in vivo* dependerem de VirB7 e ii) o complexo VirB7-VirB9-VirB10 pode ser imunoprecipitado de lisados celulares de *X. citri* empregando anticorpos contra VirB7, VirB9 ou VirB10 (Souza et al. 2011). Porém, um nocaute no gene *virB7* não inibe o desenvolvimento da doença do cancro cítrico (Souza et al. 2011). Logo, em *X. citri*, como em diversas outras espécies de *Xanthomonas* que codificam este sistema, a função deste T4SS ainda era desconhecida.

1.4.5 O T4SS como uma nanomáquina associada a matar bactérias

"Bacterial killing via a type IV secretion system" (Anexo I)

A publicação intitulada *"Bacterial killing via a type IV secretion system"* (Anexo I) (Souza et al. 2015) descreve a descoberta de que o T4SS cromossomal de *X. citri* está envolvido com a função de matar bactérias e faz parte do trabalho realizado ao longo desta tese de Doutorado. Essa publicação, que constitui uma importante parte desta Tese, foi realizada em colaboração com o Pós Doutorando Diorge Paulo de Souza e outros membros do Laboratório do Professor Shaker Chuck Farah.

Como visto no Anexo I, o modelo funcional do T4SS de *X. citri* é baseado na secreção das XVIPS de modo dependente de: i) um domínio XVPCD; ii) um T4SS funcional e iii) contato célula-célula, que culmina na morte explosiva da célula-alvo. Nota-se que as XVIPs codificam diferentes domínios N-terminais com atividades tóxicas para bactérias e na porção C-terminal codificam o domínio XVPCD que está associado a interagir com VirD4 (Alegria et al. 2005), o primeiro passo para sua eventual secreção pelo T4SS.

Na região a montante do *loci* gênico das XVIPs nota-se a presença de genes que são preditos a codificarem lipoproteínas de localização periplasmática que foram caracterizadas como proteínas de imunidade. Essas afirmações foram baseadas pela extensão dos resultados observados nos experimentos utilizando XAC2609 e XAC2610. A proteína XAC2610, apesar de não apresentar similaridade de sequência com nenhuma proteína de função conhecida, apresenta uma estrutura similar ao observado nas proteínas inibidoras de peptidoglicana hidrolases, especificamente Plil (código PDB 3OD9) e Tsi1 (código PDB 3VPJ) (Souza et al.

2015). A porção N-terminal XAC2609 que é predita a codificar um domínio glicosil hidrolase 19 (GH19) e um domínio de ligação a peptídeo glicana (PGB) apresenta a atividade de lisozima que é abolida pela presença de XAC2610 (Souza et al. 2015).

Análises de bioinformática nos banco de dados genômicos, utilizando a sequência do XVIPCD de XAC2609 como marcador, permitiram identificar centenas de XVIPs cuja porções N-terminais codificam domínios proteicos que provavelmente matam ou inibem o crescimento de outros organismos. Através dessas análises foi identificado que a presença das XVIPs estão predominantemente presentes em diversas espécies de bactéria da família de Xanthomonadaceae. Apesar disso, existe a hipótese de que os T4SSs com atividade antibacteriana não estejam restritos a família de Xanthomonadaceas, mas que é um fenômeno propagado na diversidade bacteriana.

"VirB7 and VirB9 Interactions Are Required for the Assembly and Antibacterial Activity of a Type IV Secretion System" (Anexo II)

Adicionalmente, aspectos funcionais da interação entre a porção N-terminal de VirB7 com a porção C-terminal de VirB9, e de oligomerização de VirB7-VirB7 foram dissecados em colaboração com a aluna de Doutorado Luciana Coutinho de Oliveira do Professor Dr. Roberto Kopke Salinas (Anexo II). Nesse trabalho foi evidenciado que a oligomerização formada por VirB7-VirB7 e a interação VirB7-VirB9_{CT}, identificadas no trabalho Souza et al. 2011, são importantes para o correto funcionamento do T4SS de *X.citri*. Foi identificado que o domínio N0 é essencial para o funcionamento do sistema e que a substituição do Trp34 de VirB7 por uma alanina foi capaz de abolir a interação entre VirB7-VirB9 e também da montagem do T4SS. Por fim, nesse trabalho foi identificado que a interação entre VirB7-VirB9 é

essencial para a montagem do T4SS.

1.5.6 Questões associadas à função do T4SS de *X. citri*

O T4SS de *X. citri* foi o segundo tipo de sistema de injeção bacteriano caracterizado por apresentar um coquetel de efetores preditos a hidrolisar macromoléculas presentes no envelope celular de uma bactéria alvo. O primeiro foi o T6SS de *Pseudomonas aeruginosa*, e foi caracterizado por secretar a toxina Tse1, que apresenta a atividade amidase e atua na clivagem da ligação entre os aminoácidos γ -D-isoglutâmico (D-iGlu) e L-meso diaminopimélico (m-DAP), e Tse3, que apresenta uma atividade lisozima caracterizada por clivar as ligações glicosídicas formadas pelos ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Hood et al. 2010; Russell et al. 2011) (Figura 9). Os genes *tse1* e *tse3* são localizados em *operons* bicistrônicos no qual cada um codifica uma proteína de imunidade cognata denominadas Tsi1 e Tsi3 específica para cada efector. Tsi1 e Tsi3, assim como as proteínas de imunidade de efetores da peptideoglicana do T4SS de *X.citri*, são preditas a serem localizadas no periplasma da bactéria doadora (Figura 9).

Figura 9. A) Modelo esquemático do mecanismo de secreção de efetores do T6SS. A estrutura em cinza representa o T6SS injetando as toxinas a partir de uma célula doadora para uma célula receptora. As toxinas Tse1 (e1) , Tse3 (e3) estão representadas por círculos. As proteínas de imunidade Tsi1 (i1) e Tsi3 (i3) estão representadas por quadrados e estão localizadas no periplasma da célula doadora. Citoplasma (C), Periplasma (P), Membrana interna (IM), Membrana externa (OM). Figura modificada de (Russell et al. 2011). **B)** Modelo esquemático da peptidoglicana bacteriana. GlcNAc, N-acetilglucosamina; MurNAc, ácido N-acetilmurâmico; L-Ala, L-alanina; D-iGlu, ácido D-isoglutâmico; M-Dap, ácido meso-diaminopimélico; D-Ala, D-alanina. Figura modificada de (Russell et al. 2011)

Atualmente é descrito que as proteínas de imunidade de peptidoglicana hidrolases associadas aos sistemas de secreção antibacterianos tenham como função principal proteger as células de um processo de fratricídio celular (Figura 10). Apesar de XAC2610 e Tsi1 compartilharem similaridades de estrutura e de localização celular, os T4SSs e T6SSs são sistemas evolutivamente distintos e, por consequência, existem diferenças associadas à dinâmica de funcionamento desses sistemas. Portanto, questionamos: essas proteínas são apenas necessárias para impedir um mecanismo de fratricídio celular? Existiriam outros aspectos biológicos relevantes que ainda não foram identificados para essa família de proteínas recém-

descobertas?

Figura 10. Mecanismo de fraticídio celular dependente das proteínas inibidoras Tsi1 e Tsi3 do T6SS de *Pseudomonas aeruginosa*. A) Modelo representativo da interface entre células irmãs que secretam no periplasma de uma na outra as toxinas Tse1 e Tse3 de modo dependente do T6SS (estrutura em cinza). A célula superior não produz as proteínas de imunidade Tsi1 e Tsi3 e observa-se a camada de peptidoglicano é degradada, culminando no processo de fraticídio. B) Situação similar no item (A), porém ambas as células produzem as proteínas de imunidade que as protegem de uma situação de fraticídio. Citoplasma (C); Membrana interna (IM); membrana externa (OM); Periplasma (P). A camada de peptidoglicano é representada por hexágonos amarelos. As toxinas são Tse1 e Tse3 e proteínas de imunidade Tsi1 e Tsi3 estão representadas por formas geométricas circulares e quadradas, respectivamente.

No *locus vir* do T4SS de *X. citri*, constata-se a presença do gene *xac2611* que é vizinho de *virB6* (*xac2612*) e *xac2610*. A análise de sequência indica que XAC2611 seja uma lipoproteína de localização periplasmática e que tenha um domínio de função desconhecida classificado como DUF4189. Adicionalmente, próximo do *locus vir* do T4SS de *X. citri*, existem cópias truncadas de *VirB6* codificada pelos genes *xac2608* e *xac2607* e também uma duplicação aparente de XAC2611 codificado pelo gene *xac2606*. Tendo em vista que o *locus vir* do T4SS de *X. citri* é funcional, é possível pensar que XAC2611 ou XAC2606 possam estar relacionadas com algum aspecto funcional do T4SS de *X. citri* ainda não descrito.

Baseado nos que foi observado nos ensaios de duplo híbrido (Alegria et al.

2005), a primeira questão é saber se a interação entre as XVIPs e a proteína VirD4 é de fato mediada diretamente pelo domínio XVIPCD. Também, outro aspecto é entender a presença de regiões mais conservadas de sequência no domínio XVIPCD. Podemos questionar se essas regiões podem ser importantes para a interação com VirD4? Também, uma questão de grande importância é saber se a interação entre VirD4 e o domínio XVIPCD é importante para a secreção de uma XVIP via o T4SS? Além disso, aspectos biofísicos e estruturais da interação entre VirD4 e os sinais de secreção são desconhecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente projeto de doutoramento teve como objetivo entender os aspectos estruturais e funcionais desempenhados pela rede de interações formada por VirD4-XAC2609 e XAC2609-XAC2610 e identificar fenótipos dependentes e substratos secretados por T4SS de *X. citri*

2.2 Objetivos específicos

- Identificar substratos secretados por *X. citri* através da técnicas de imunodeteção
- Identificar diferenças fenotípicas de mutantes de *X.citri* em genes no locus vir ($\Delta xac2609$, $\Delta xac2610$ e $\Delta xac2611$, $\Delta virB5$ e $\Delta virB11$).
- Caracterizar por técnicas bioquímicas, biofísicas e funcionais a interação entre VirD4 e substratos do T4SS (XVIPs).
- Identificar interações importantes para a formação do complexo VirD4-XVIPCDs

3. METODOLOGIA

3.1. Clonagem gênica e técnicas de Biologia Molecular

3.1.1 Amplificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A partir da sequência genômica de *X. citri* foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 2) para amplificação da região 197-355 da proteína VirD4 (VirD4_{AAD}) de *X. citri*, codificado pelo gene *xac2623*. O desenho dos oligonucleotídeos de VirD4_{AAD} foi baseado a partir do alinhamento de sequência junto com o alinhamento da previsão de estrutura secundária de VirD4 com a estrutura secundária observada no cristal de TrwB (Gomis-Rüth et al. 2001). Os softwares utilizados para os alinhamentos de sequência primária e predição de estrutura secundária foram CLUSTAL O (Sievers et al. 2011) e Phyre2 (Kelley et al. 2015), respectivamente. Foram desenhados também oligonucleotídeos para obtenção de *amplicons* para construção das cepas nocautes dos genes *xac2609*, *xac2610*, *xac2611*, *virB5*, *virB11* (Tabela 3) e complementação episomal dos respectivos genes (Tabela 4). Em cada oligonucleotídeo, nas extremidades 5', foram adicionadas sequências reconhecidas por enzimas de restrição específicas para clonagem molecular.

Nos oligonucleotídeos que apresentam a orientação *forward* (F), a sequência de nucleotídeos **ATG** presente nos sítios de restrições das enzimas *NdeI* (CAT**ATG**) e *NcoI* (CC**ATGG**) foi utilizada como o Início da Fase de Leitura (ORF) da região amplificada pela reação de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase). A jusante e em fase com o *códon* de iniciação, foram adicionadas as regiões codificantes das proteínas e domínios proteicos que alinham diretamente no DNA genômico de *X. citri*. Adicionalmente, ao longo da sequência dos oligonucleotídeos que apresentam

a orientação *reverse* (R), foi inserido um *códon* reverso complemento da terminação da tradução (TTA) em fase com o códon de iniciação **ATG** presente nos oligonucleotídeos de orientação F. Para os cálculos das temperaturas dos anelamentos, foi utilizada a versão do programa 3.0 Gene Runner (Hastings Software, 1994).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem em vetor de expressão pET28a.

Oligonucleotídeo (Orientação/Gene / sítio restrição)	Sequência 5' → 3' (Sítios de restrição sublinhados, códon de iniciação (ATG) e o reverso complemento do códon de terminação (TTA) em itálico negrito)	Região amplificada
F/virD4 _{AAD} ⁻ /NdeI	CACCATGCAT <u>ATG</u> CATCGCTGGAATCCATTGAC	197-355
R/virD4 _{AAD} /XhoI	ATCTGCTCGAG <u>TTA</u> GGTCATCTTCTTGTGCGAAGG	

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem em vetor suicida pNPTS138a

Oligonucleotídeo (Orientação/Região <i>upstream</i> ou <i>downstream</i> / sítio restrição/ gene que alvo para nocaute)	sequência 5' → 3' (Sítios de restrição sublinhados,) regiões autocomplementares em itálico
Oligonucleotídeos para nocaute de xac2610	
F/ <i>upstream</i> /BamHI/ <i>xac2610</i>	TTCTGGATCCGGCCTCTGTTTCATCCTGTGT
R/ <i>upstream</i> /NcoI/ <i>xac2610</i>	TACATCCATGGACTGCAAGCTGTGATCGAGA
F/ <i>downstream</i> /NcoI/ <i>xac2610</i>	TACATCCATGGACCGAAGACACGAATGATCC
R/ <i>downstream</i> /BamHI/ <i>xac2610</i>	TTCTGGATCCGCCTCGAGCTTGCTCACT
Oligonucleotídeos para nocaute de xac2609	
F/ <i>upstream</i> /BamHI/ <i>xac2609</i>	TTCTGGATCCTATTTCGGGCTGTTCTGATCC
R/ <i>upstream</i> /EcoRI/ <i>xac2609</i>	TACATGAATTCATCCACACCAAAGCCTTCAG
F/ <i>downstream</i> /EcoRI/ <i>xac2609</i>	TACATGAATTCAGACCCAGGAAAGTGCTTC
R/ <i>downstream</i> /BamHI/ <i>xac2609</i>	TTCTGGATCCCTAGATCCCTGTCCAGACG
Oligonucleotídeos para nocautes xac2611	
F/ <i>upstream</i> /BamHI/ <i>xac2611</i>	TTCTGGATCCTGGTTTACCTGTTTAGGCAACA
R/ <i>upstream</i> /EcoRI/ <i>xac2611</i>	TACATGAATTCAGGGGCAGTCCAACCTTACAA
F/ <i>downstream</i> /EcoRI/ <i>xac2611</i>	TACATGAATTCATTTCGGGCTGTTCTGATCC
R/ <i>downstream</i> /BamHI/ <i>xac2611</i>	TTCTGGATCCTTCTCCGTACGTGCATATCATT
Oligonucleotídeos para nocautes virB5 (xac2613)	
F/ <i>upstream</i> /BamHI/ <i>virB5</i>	ATAGGATCCTTCGTGCGCGCGTGC
R/ <i>upstream</i> / <i>virB5</i>	TTGTTCGATCTCGTGCTGGACTGACTATGC
F/ <i>downstream</i> / <i>virB5</i>	TCCAGGCACGAGATCGACAAGGACTGATG
R/ <i>downstream</i> /BamHI/ <i>xac2611</i>	GTGGGATCCGCGAGAATACGCCGTGAAC
Oligonucleotídeos para nocautes virB11	
F/ <i>upstream</i> /BamHI/ <i>virB11</i>	ATTGGATCCGGCCCTGGTGTCTTCTTGCA
R/ <i>upstream</i> / <i>virB11</i>	CGCCGTCCGGAGTCATCGATCGTCAT
F/ <i>downstream</i> / <i>virB11</i>	GACTCCGGACGGCGCTTCATCACG
R/ <i>downstream</i> /BamHI/ <i>virB11</i>	GTGGGATCCTATCGATTTCAAACCTTCATGTCTAACT

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de genes em vetor pBRA

Oligonucleotídeo (Orientação/Gene/sítio restrição/ região de enelamento)	Sequência 5' → 3' (Sítios de restrição sublinhados e códon de iniciação (ATG) e o reverso complemento do códon de terminação (TTA) em italico negrito)	Região amplificada
F/xac2609/ <i>Bam</i> HI <i>Nco</i> I/5-21	AAAGGATCCAAC CCATGG GCGATGGACGTGGTCGG	1-431
R/xac2609/ <i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I/1293-1274	CCCAAGAATT CGTCGAC TTAC ATGGACATTGAGCGCGAA	1-431
F/xac2610/ <i>Bam</i> HI <i>Nco</i> I/5-24	AAAGGATCCAAC CCATGG TGACGCGCGAATTAGCAAGG	1-267
R/xacx2610/ <i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I/814-794	CCCCAAGAATT CGTCGAC TTAG TTGGACACCTCCTTCATTT C	1-267
R/xac2609/ <i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I/939-924	GAAAAGAATT CGTCGAC TTAG GGGGCTGGAGGCTGC	1-308
F/xac2611/ <i>Nco</i> I/5-31	TCC CCATGG TTATTATCCGCTTGGCTTCAATTATTC	1-164
R/xac2611/ <i>Sal</i> I/495-473	CCGG TCGAC TTA ATATTCTTGAATATTGGATCAGAAC	1-164

As reações de PCR, em um volume final de 50 µL, continham tampão de acordo com especificação do fabricante (*Thermo Fisher Scientific*), 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 1U de *PFU* DNA Polimerase. As temperaturas e tempos utilizados nas etapas das reações de PCR estão sumarizadas na Tabela 5. O equipamento utilizado foi o termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Tabela 5. Parâmetros utilizados para as amplificações por PCR

Etapas de Reação		Temperatura	Tempo de reação
Desnaturação Inicial		94 °C	2 minutos
5 ciclos	Desnaturação	94 °C	30 segundos
	Anelamento	Temperatura de anelamento 1 *	30 segundos
	Extensão	72 °C	2min/Kb
24 ciclos	Desnaturação	94 °C	30 segundos
	Anelamento	Temperatura de anelamento 2*	30 segundos
	Extensão	72 °C	2min/Kb
Extensão Final		72 °C	10 min

^{1*} A Temperatura de anelamento 1 foi estimada a partir da porção 3' dos oligonucleotídeos que alinham diretamente no DNA genômico de *X.citri*. A Temperatura de anelamento 2 foi estimada a partir da sequência integral dos oligonucleotídeos.

3.1.2 Clonagens de gênica em vetores pET28a, pBRA e pNPTS138a

Nesta etapa, os *amplicons* (produtos de PCR) e os plasmídeos pET28a (Novagen; Figura 11) (Studier and Moffatt 1986; Rosenberg et al. 1987), pBRA (Figura 12) e pNPTS138 (Figura 13) foram digeridos com as enzimas de restrição cognatas. Após a digestão, os produtos de clivagens foram separados em gel de agarose, purificados e então os pares *amplicon*-vetor foram ligados com T4-DNA ligase (New England Biolabs), empregando uma razão molar de 3:1 de *amplicon*:vetor (0.075 pmol :0.025 pmol). A reação de ligação era então incubada ao longo de 12 horas a 18°C.

Figura 11. Representação esquemática do plasmídeo pET28a para produção de proteínas recombinantes. Kan: resistência a Canamicina; *ori*: origem de replicação; *lacI*: repressor lac. Em preto: região de clonagem / expressão promotor T7, operador lac, sequência Shine-Dalgarno, sítio múltiplo de clonagem e terminador T7 da transcrição.

Figura 12. Representação esquemática do vetor pBRA utilizado para complementação episssomal em *X. citri*. A origem de replicação do pBBR1 ori é compatível com *Escherichia coli* e *Xanthomonas* (Kovach et al. 1995). O gene *araC* codifica um *ativador transcricional* da região promotora PBAD na presença de Arabinose. *spct*: resistência a espectinomicina; *str*: resistência a estreptomicina. A região *mob* permite que o vetor pode ser transferido por conjugação. Sítio de clonagem múltipla (MCS). Vetor pBRA foi construído pela doutora Miriam Marroquim, ex integrante do laboratório do Professor Shaker Chuck Farah.

Figura 13. Representação esquemática do plasmídeo pNPTS138a para produção das cepas nocautes. Km^R: resistência a canamicina; oriT: origem de transferência; colE1 ori: origem de replicação em *E. coli*. sacB: gene codificador de Levansucrase. M13 ori: origem de replicação de Fago M13. O sítio de clonagem múltiplas está notado na porção superior.

Foram realizados os procedimentos de subclonagens da região codificante de XAC2609 e da região 311-431 de *xac2609* presentes nos plasmídeos pET11a-XAC2609₁₋₄₃₁ e pET11a-XAC2609₃₁₁₋₄₃₁ (Souza, 2010) para o vetor pET28a. Para este procedimento, o vetor pET28a e os vetores pET11aXAC2609₁₋₄₃₁ e pET11aXAC2609₃₁₁₋₄₃₁ foram submetidos a reação de clivagem pelas enzimas *NdeI* e *BamHI*. Após o tempo de reação, os insertos provenientes das clivagens dos plasmídeos pET11a-XAC2609₁₋₄₃₁ e pET11a-XAC2609₃₁₁₋₄₃₁ foram separados do vetor pET11a por purificação em gel de agarose. Os pares *amplicon*-vetor foram ligados com T4-DNA ligase (New England Biolabs), empregando uma razão molar de 3:1 de *amplicon*:vetor (0,075 pmol:0,025 pmol). A reação de ligação era então incubada ao longo de 12 horas a 18°C.

Cerca de 2 µL das reações de ligações foram transferidas para microtubos contendo 200 µL de células *E. coli* DH5α competentes. As células com a reação de ligação foram incubadas por 30 minutos no gelo. A seguir, as células foram incubadas a 42°C por 2 minutos e resfriados no gelo por 5 minutos. Após,

foram adicionados 500 µL de meio 2x TY e em seguida as células foram colocadas sob agitação a 150 rpm por 45 minutos a 37°C. Após este tempo, 200 µL das células foram plaqueadas em placas meio LB agar 1,5% contendo canamicina (50 µg/mL) para seleção de clones em pET28a e pNPTS138 e espectinomicina (100 µg/mL) para seleção de clones em vetores pBRA. As placas de cultura foram incubadas a 37°C por 16-20 horas. A seleção de clones para reação de sequenciamento foi baseada a partir de PCRs de colônias e também pelo padrão de restrição dos plasmídeos isolados daquelas colônias sobreviventes em meio contendo o antibiótico de seleção. Na Tabela 6, estão notados todos os plasmídeos obtidos nesta parte do trabalho.

Tabela 6. Plasmídeos construídos para expressão heteróloga de proteínas de *X. citri* em *E. coli*, complementação epissomal em *X. citri* e nocaute de genes em *X. citri*. A cauda de Histidina N-Terminal está notada pelo termo "HIS" ao longo desta Tese.

Plasmídeo	Enzimas de restrições utilizadas no processo de clonagem em vetor	Finalidade Experimental
pET28a-VirD4 _{HIS-197-355}	<i>NdeI/XhoI</i>	Expressão heteróloga de VirD4 _{HIS-AAD} em <i>E. coli</i>
*pET11a-XAC2609 ₁₋₄₃₁	<i>NdeI/BamHI</i>	Expressão heteróloga de XAC2609 em <i>E. coli</i>
*pET11a-XAC2609 ₃₁₁₋₄₃₁	<i>NdeI/BamHI</i>	Expressão heteróloga de XAC2609 _{XVIPCD} em <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 _{HIS-1-431}	<i>NdeI/BamHI</i>	Expressão heteróloga de XAC2609 _{HIS} em <i>E. coli</i>
pet28a-XAC2609 _{HIS-311-431}	<i>NdeI/BamHI</i>	Expressão heteróloga de XAC2609 _{HIS-XVIPCD} em <i>E. coli</i>
pBRA-XAC2609 ₁₋₄₃₁	<i>NcoI/SalI</i>	Complementação epissomal de <i>xac2609</i> em <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ₁₋₃₀₈	<i>NcoI/SalI</i>	Complementação epissomal da região codificante da poção N-Terminal de XAC2609 (<i>xac2609</i> ₁₋₃₀₈) em <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2610 ₁₋₂₆₇	<i>NcoI/SalI</i>	Complementação epissomal de <i>xac2610</i> em <i>X. citri</i>
pNPTS138a- Δ <i>xac2609</i>	<i>BamHI</i>	Nocaute gênico de <i>xac2609</i> em <i>X. citri</i>
pNPTS138a- Δ <i>xac2610</i>	<i>BamHI</i>	Nocaute gênico de <i>xac2610</i> em <i>X. citri</i>
pNPTS138a- Δ <i>xac2610</i>	<i>BamHI</i>	Nocaute gênico de <i>xac2611</i> em <i>X. citri</i>
pNPTS138a- Δ <i>virB11</i>	<i>BamHI</i>	Nocaute gênico de <i>virB11</i> (<i>xac2618</i>)
pNPTS138a- Δ <i>virB5</i>	<i>BamHI</i>	Nocaute gênico de <i>virB5</i> (<i>xac2613</i>)

* Plasmídeos construídos ao longo do trabalho de Tese do Dr. Diorge Paulo de Souza, 2010.

3.1.3 Reações de Mutações sítio dirigida

A reação de mutação sítio dirigida por PCR de extensão e sobreposição é realizada através da amplificação do DNA alvo por reação de PCR com o uso de oligonucleotídeos que apresentam a sequência que se deseja alterar. Após o ciclo de amplificação, o DNA parental metilado e hemimetilado é digerido com enzima *DpnI*. Ao final da reação é obtido um *amplicon* plasmidial contendo a sequência de

interesse.

Reações de mutações foram feitas com o uso do *Kit* de mutagênese sítio dirigida *Quik Change II XL* (Agilent). Foram utilizados os vetores pBRA-XAC2609₁₋₄₃₁, pET28a-XAC2609₃₁₁₋₄₃₁, pBRA-XAC2609₁₋₃₀₈ e pBRA-VirD4 como DNA moldes de reação. Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de mutações sítio dirigidas estão notados na Tabela 7 e as suas sequências foram determinadas com uso do software "*QuikChange Primer Design*" (Agilent). Para cada reação, foram adicionados: 5 µL do tampão de reação, 10 ng do DNA molde, 125 ng de cada par de primer, 1 µL do mix de dNTPs, 3 µL da solução *QuickSolution*; 1 µl de DNA polimerase *Pfu Ultra HF* e água *MiliQ* para um volume final de 50 µL. As amplificações dos plasmídeos mutantes foram realizadas pela técnica de PCR, os parâmetros utilizados nas etapas de reações estão notados na Tabela 8. Ao fim do ciclo de reação, foi adicionado 1 µl (10 U/ µl) da enzima de restrição *Dpn I* diretamente em cada reação de mutação sítio dirigida. As reações foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Em seguida, 5 µl de cada reação foi utilizado para transformação por choque térmico em células competentes de *E. coli* DH5α. Colônias provenientes de transformação com plasmídeos pET28a selecionadas por Canamicina a 50 ug/mL e aquelas proveniente do vetor pBRA foram selecionados por espectinomicina a 100 ug/mL. Após o processo de seleção, as células de *E. coli* foram cultivadas em meio 2x TY e submetidas a extração de DNA plasmidial com kit de *miniprep*. Na Tabela 9 estão notados os plasmídeos obtidos nesta etapa de trabalho.

Tabela 7. Primers utilizados para as reações de mutações sítios dirigidas

Oligonucleotídeos : gene/Orientação/códons alterados	Sequência dos oligonucleotídeos 5' > 3'
<i>xac2609/F/H315A P316A D317A</i>	TGTTGTCTGATCCGCGCGCTGCCGCCAACGCGATGTACAACG
<i>xac2609/R/H315A P316A D317A</i>	CGTTGTACATCGCGTTGGCGGCAGCGCGCGGATCAGACAACA
<i>xac2609/F/G336W</i>	CTTGCGGTTGGCAAACCAGCCACGTTACCCAG
<i>xac2609/R/G336W</i>	CTGGGTGAACGTGGCTGGTTGCCAACCGCAAG
<i>xac2609/F/D363A</i>	GTTGGGTACCACATGAGCGATGCGTTGCAAACC
<i>xac2609/R/D363A</i>	GGTTTGCAACGCATCGCTCATGTGGTACCCAAC
<i>xac2609/F/ F375A V377A</i>	TCGCCCTGCGCTGCGGCAAAGCCGTCGCCGCTCT
<i>xac2609/R/ F375A V377A</i>	AGAGCGGCGACGGCTTTGCCGCGAGCGAGGGCGA
<i>xac2609/F/ D383A P384A</i>	CGCTGCATTGCCGCGCGGTCAGCTCGCC
<i>xac2609/R/ D383A P384A</i>	GGCGAGCTGACCGCGCGGCAATGCAGCG
<i>xac2609/F/A396M</i>	TCCAACGGCTGATTCTGCATTTGATTGCGATCCACAAAAAC
<i>xac2609/R/A396M</i>	GTTTTTGTGGATCGCAATCAAATGCAGAAATCAGCCGTTGGA
<i>xac2609/F/P400A</i>	CTGCTGTTTTCCAACGCCTGATTCTGCGCTTGA
<i>xac2609/R/P400A</i>	TCAAGCGCAGAATCAGGCGTTGGAAAAACAGCAG
<i>xac2609/F/426S_Stop Codon</i>	GACATTGAGCGCTAAGCACTTTCCTGGGTCTGC
<i>xac2609/R/426S_Stop Codon</i>	GCAGACCCAGGAAAGTGCTTAGCGCTCAATGTC
<i>xac2609/F/E48A (Souza et al. 2015)</i>	GCGACGGCTCAACATGCGACGCGTAATTTTCAG
<i>xac2609/R/E48A (Souza et al. 2015)</i>	CTGAAAATTACGCGTCGCATGTTGAGCCGTCGC
<i>xac2623/F/K1443</i>	CGACGCCCCGTACCCGAGCGCGTCG
<i>xac2623/R/K1443</i>	CGACGCGCTCGGGTACGGGCGTCG

Tabela 8. Parâmetros utilizados para as reações de mutações sítio dirigidas

Etapa de Reação		Temperatura	Tempo de reação
Desnaturação Inicial		95 °C	1 minuto
18 ciclos	Desnaturação	95 °C	50 segundos
	Anelamento	60 °C	50 segundos
	Extensão	68 °C	10 min
Extensão Final		72 °C	10 min

Tabela 9 . Plasmídeos desenhados para mutações sitio dirigidas.

Plasmídeo	Produto recombinante / Organismo produtor
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{H315A P316A D317A}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{H315A P316A D317A} / <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{G336W}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{G336W} / <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{D363A}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{D363A} / <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{F375A V377A}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{F375A V377A} / <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{D383A P384A}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{D383A P384A} / <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{A396M}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{A396M} / <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{P400A}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{P400A} / <i>E. coli</i>
pET28a-XAC2609 ^{HIS-311-431} ^{S426Ter}	domínio XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{S426Ter} / <i>E. coli</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{H315A P316A D317A}	XAC2609 ^{H315A P316A D317A} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{G336W}	XAC2609 ^{G336W} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{D363A}	XAC2609 ^{D363A} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{F375A V377A}	XAC2609 ^{F375A V377A} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{D383A P384A}	XAC2609 ^{D383A P384A} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{A396M}	XAC2609 ^{A396M} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{P400A}	XAC2609 ^{P400A} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{S426Ter}	XAC2609 ^{S426Ter} / <i>X. citri</i>
pBRA-XAC2609 ¹⁻³⁰⁸ ^{E48A}	XAC2609 ^{E48A} / <i>X. citri</i>
pBRA-VirD4 ^{K144I}	VirD4 ^{K144I} / <i>X. citri</i>

Todos os insertos e construções utilizadas nesta Tese foram sequenciados com o uso do reagente “*Big Dye Terminator*”. As reações de sequenciamento eram enviadas para a o Laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Microorganismos, IQ/USP para análise no sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems). Os cromatogramas das sequências eram e analisados com o software CHROMAS (Technelysium).

3.1.4 Construção das cepas nocautes de *X. citri*

Para construção das cepas nocautes utilizamos o vetor suicida pNPTS138a (Figura 13) contendo as duas regiões flangeadoras do gene que se deseja excluir. O vetor pNPTS138a não apresenta capacidade replicativa em *X. citri*. Este plasmídeo confere resistência ao antibiótico canamicina e codifica a enzima *Levansucrase* (gene *sacB*), uma hexosiltransferase que transfere unidades de frutose de sucrose para polímeros de frutose (2,6-beta-D-fructosyl)_n. O gene *sacB* é empregado como um marcador de seleção negativa porque o acúmulo deste polímero no periplasma de células Gram negativas é tóxica.

O nocaute gênico ocorre em duas etapas consecutivas de recombinações homólogas (Figura 14). O primeiro evento de recombinação ocorre após a transformação de *X. citri* com o vetor contendo um fragmento nocaute. Este processo resulta na inserção do vetor pNPTS138a com o fragmento nocaute no genoma, gerando um *X. citri* merodiplóide (Figura 14A). Como consequência, *X. citri* adquire resistência à canamicina e se torna suscetível à sacarose. No segundo evento, ocorre a deleção do gene de interesse e *X. citri* volta a ser suscetível a canamicina e resistente à sacarose (Figura 14B).

Figura 14. Esquema representativo do mecanismo de nocaute em *X. citri* com o uso do vetor suicida pNPTS138a. **A)** Primeiro evento de recombinação: Na Figura está representado o genôma de *X. citri* (Xac) com duas regiões flangeadoras (vermelho e amarela) de um gene que se deseja deletar (azul). A abaixo, a Figura retangular representa o vetor pNPTS138a que contém: mesmas regiões flangeadoras (vermelho e amarela) presentes no genoma de *X. citri*; Um gene truncado (verde) que geralmente é composto de uma pequena região N-terminal e C-terminal da proteína que se deseja excluir. O gene de resistência à canamicina (Km^R) (cinza) e o gene *sacB* (rosa) codificador da Levansucrase. O primeiro evento de recombinação ocorre entre uma das regiões flangeadoras (vermelha ou amarela) que apresentam identidade de sequências, podendo gerar dois tipos de merodiplóides finais: A(1) e A(2) respectivamente. Nesta etapa *X. citri* apresenta resistência à canamicina e é suscetível à Sacarose. Também nota-se que há duas cópias do gene de interesse, uma inteira (azul) e outra truncada (verde). **B)** Segundo evento de recombinação tem como consequência as deleções do gene de interesse, do gene de resistência à canamicina e gene codificador de SacB. Nota-se que neste evento, há em princípio

iguais chances de eliminar qualquer uma das cópias do gene de interesse, gerando cepas mutantes ou cepas nocautes.

Inicialmente, foram feitas construções dos fragmentos nocautes com cerca de 2kb de comprimento. Cada fragmento continha as regiões flanqueadoras dos genes que foram nocauteados: *xac2609*, *xac2610*, *xac2611* (Figura 15). Para isto, foram utilizados os oligonucleotídeos notados na Tabela 3 e seguiu-se um protocolo geral de trabalho descrito de acordo com a Figura 16.

Figura 15. Esquema ilustrativo das regiões utilizadas para construção dos fragmentos nocautes de *xac2609*, *xac2610* e *xac2611*. Em vermelho estão notadas as regiões flangeadoras do nocaute de interesse que foram amplificadas e fusionadas para formação dos insertos. **A)** Inseto nocaute de *xac2609*, contém os 13 primeiros e os 15 últimos códon. **B)** Inseto nocaute de *xac2610* contém os 28 primeiros e os 26 últimos códon. **C)** Inseto nocaute de *xac2611* contém os 13 primeiros e os 18 últimos códon.

Figura 16. Diagrama de fluxo seguido para obtenção dos fragmentos que apresentam a região de recombinação. Na Figura, estão ilustradas 3 regiões distintas de um genoma genérico: A amarela (aquele que se deseja nocautear) e os genes flanqueadores vermelho e verde (utilizados para o processo de recombinação homologa). Em **A**: Amplificação das regiões flanqueadoras contendo uma pequena região codificante do gene de interesse. **B**: Clivagem com enzimas de restrições em apenas uma única extremidade de cada *amplicom*, de forma que a porção clivada seja aquela correspondente ao C-terminal e N-terminal do gene que se deseja excluir. **C**: Ligação dos amplicons, espera-se obter como produto final um fragmento contendo regiões flanqueadoras e uma pequeno fragmento híbrido (em fase) contendo uma região codificante do gene que será nocauteado. **D**: Ligação no plasmídeo suicida pNPTS138A.

Para construção dos plasmídeos suicidas para nocautear os genes *xac2609*, *xac2610* e *xac2611*, foram amplificados por PCR as regiões flangeadoras dos genes alvos. Um fragmento de 1 kb localizado a jusante e outro de 1 kb a montante do gene que se desejava nocautear. Cada *amplicon* continha uma pequena porção N-terminal ou C-terminal do gene alvo. Após a purificação, os *amplicons*, eram clivados nas extremidades codificadoras da região N-terminal e C-terminal com o uso da mesma enzima de restrição (Figura 16). Em seguida, os fragmentos foram ligados com o uso da enzima *T4 DNA ligase*, obtendo-se ao fim o fragmento nocaute, com cerca de 2kb de extensão contendo apenas as regiões flangeadoras e um pequeno fragmento da região codificadora do gene que se desejava nocautear. Estes fragmentos foram então inseridos no plasmídeo pNPTS138a de acordo com protocolo de clonagem anteriormente descrito.

Para o nocaute de *virB11* e *virB5*, após a amplificação das regiões a montante e jusante de cada ORF destes genes, os produtos de PCR foram misturados em razão molar 1:1 e foi realizada uma segunda reação de PCR utilizando os pares *primers* externos para cada reação (F/upstream e R/downstream). Após essa reação foi obtido o fragmento nocaute de 2Kb para cada gene. Essa etapa de amplificação foi possível devido à inserção de sequências auto-complementares nos *primers* internos (R/upstream e F/downstream) para cada reação (Tabela 3).

As células de *X. citri* foram eletroporadas com os plasmídeos pNPTS138A contendo os fragmentos nocaute. Para isso, inóculos de *X. citri* foram crescidos em 25 mL de meio Circlegrow (MP Biomedicals) 40 g/L a 28 °C, 200 rpm de agitação até D.O._(600nm) 0.5 e então centrifugados (4000 rpm, 10 °C e 15 minutos). Em seguida eram realizados 2-3 etapas de lavagens das células com água destilada e

centrifugações. Os pellets eram resuspendidos com o volume residual da última lavagem. Após, as células eram aliquotadas em microtubos (50 µL) e adicionados cerca de 60 ng do plasmídeo pNPTS138a contendo o inserto nocaute. A mistura célula-DNA eram eletroporadas com o uso do aparelho Gene pulser (Bio-RAD) (2,0KV; 25 µF e 200 ohms).

Para o primeiro evento de recombinação, cultivou-se os transformantes de *X. citri* em meio 2x TY com 100 µg/mL de canamicina, de forma selecionar aqueles que apresentaram o plasmídeo já inserido no genoma de *X. citri*. Colônias suscetíveis a sacarose (5%) e resistentes a canamicina foram selecionadas. Para estimular o segundo evento de recombinação, as células eram crescidas em meio 2x TY durante a noite e em seguida cultivadas em placas de meio LB agar contendo ampicilina e 5% sacarose. Após três dias de cultivo, eram selecionadas as colônias suscetíveis a canamicina e resistentes a sacarose. As confirmações dos nocautes eram realizadas por técnica de PCR de colônia e Western-Blot.

Adicionalmente, foram deletados os gene *xac2610* das cepas mutantes *X. citri* Δ VirB7 (Souza et al. 2011) e *X. citri* Δ VirD4 (Souza et al. 2015). Foi também construída a cepa duplo mutante dos genes *xac2609* e *xac2610* com o uso do plasmídeo pNPTS138a Δ *xac2609* Δ *xac2610*, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo.

3.1.5 Produção de cepas marcadas com GFP e complementadas de *X. citri*

Células eletrocompetentes de *X. citri* mutantes e selvagens foram transformadas com plasmídeos pBBR-5GFP (Souza et al. 2015) que expressa constitutivamente a proteína citoplasmática GFP e confere resistência a gentamicina (20 µg/mL). Também foram transformadas cepas de *X. citri* com plasmídeos

derivativos do vetor pBRA (Souza et al. 2015) que confere resistência a espectinomicina (100 µg/mL) e que pode ser induzido por arabinose. Na Tabela 10 estão notadas as cepas de *Xanthomonas* utilizadas ao longo deste projeto.

Tabela 10. Cepas de *X. citri* utilizadas ao longo deste trabalho

Cepa de <i>X. citri</i>	Genótipo	Referência
<i>X. citri</i> Selvagem	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> strain 306 (<i>X. citri</i>), cepa selvagem de <i>X. citri</i>	(da Silva et al. 2002)
<i>X. citri</i> $\Delta virB7$	<i>X. citri</i> $\Delta virB7$	(Souza et al. 2011)
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610$	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610$	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$	Este Projeto
<i>X. citri</i> Selvagem GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> selvagem ;pBBR-5GFP; pBRA	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta virB7$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta virB7$; pBBR-5GFP ; pBRA	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta virB7$ GFP + VirB7	<i>X. citri</i> $\Delta virB7$; pBBR-5GFP; pBRA-VirB7	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta virD4$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta virD4$; pBBR-5GFP; pBRA	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta virD4$ GFP + VirD4	<i>X. citri</i> $\Delta virD4$; pBBR-5GFP; pBRA-VirD4	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta virD4$ GFP + VirD4 ^{K144T}	<i>X. citri</i> $\Delta virD4$; pBBR-5GFP; pBRA-VirD4 ^{K144T}	Este Projeto
<i>X. citri</i> Selvagem GFP + VirD4 ^{K144T}	<i>X. citri</i> selvagem; pBBR-5GFP; pBRA-VirD4 ^{K144T}	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610$; pBBR-5GFP; pBRA	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610$ GFP + XAC2610	<i>X. citri</i> c $\Delta xac2610$; pBRA-XAC2610; pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta virB7$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta virB7$; pBRA; pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta virB7$ GFP + Xac2610	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta virB7$; pBRA-XAC2610	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta virD4$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta virD4$; pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$; pBRA ; pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$ GFP + XAC2609FL	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$; pBRA-XAC2609 ₁₋₄₃₁ pBBR-5GFP;	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$ GFP + XAC2609Nt	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$; pBRA-XAC2609 ₁₋₃₀₈ ; pBBR-5GFP;	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$ GFP + XAC2609Nt ^{E48A}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2610\Delta xac2609$; pBRA-XAC2609 ₁₋₃₀₈ ^{E48A} ; pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$; pBRA; pBBR-5GFP	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$; pBRA-XAC2609 ₁₋₄₃₁ , pBBR-5GFP	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609Nt	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$; pBRA-XAC2609 ₁₋₃₀₈ , pBBR-5GFP	(Souza et al. 2015)*
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + Xac2609 ^{H315A P316A D317A}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$; pBRA-XAC2609 ₁₋₄₃₁ ^{H315A P316A D317A} , pBBR-5GFP	Este Projeto

<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609 ^{G336W}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$, pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{G336W} , pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609 ^{D363A}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$, pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{D363A} , pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609 ^{F375A V377A}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$, pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{F375A V377A} , pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609 ^{D383A P384A}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$, pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{D383A P384A} , pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609 ^{A396M}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$, pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{A396M} , pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609 ^{P400A}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$, pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{P400A} , pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$ GFP + XAC2609 ^{S426Ter}	<i>X. citri</i> $\Delta xac2609$; pBRA-XAC2609 ¹⁻⁴³¹ ^{S426Ter} , pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2611$ GFP pBRA Φ	<i>X. citri</i> $\Delta XAC2611$; pBRA; pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta xac2611$ GFP + XAC2611	<i>X. citri</i> $\Delta xac2611$; pBRA-XAC2611; pBBR-5GFP	Este Projeto
<i>X. citri</i> Selvagem GFP + Xac2611	<i>X. citri</i> selvagem; pBBR-5GFP; pBRA-XAC2611	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta virB11$	<i>X. citri</i> $\Delta virB11$	Este Projeto
<i>X. citri</i> $\Delta virB5$	<i>X. citri</i> $\Delta virB5$	Este Projeto

3.2. Expressão e purificação das proteínas heterológicas

3.2.1 Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Cepas de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com os plasmídeos de expressão heteróloga pET28a e pET11a contendo os genes de interesse. Após transformação por choque térmico, colônias isoladas de *E. coli* eram inoculadas em 5 mL de meio 2x TY e crescidas durante a noite (37°C, agitação de 200 rpm). Em seguida, as culturas foram diluídas em volume de 500 mL (D.O._(600nm) final de 0,05) em meio 2_X TY com canamicina (50 µg/mL) ou ampicilina (150 µg/mL). Os inóculos eram então cultivados até D.O._(600nm) = 0,7 (37°C, agitação de 200 rpm). Neste momento a temperatura era ajustada para a temperatura de expressão (Tabela 11) e após o equilíbrio, era adicionado de IPTG para concentração final de 0,5 mM. A Tabela 11 apresenta as condições de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*

BL21 com o uso dos plasmídeos pET11a e pET28a.

Tabela 11. Plasmídeos utilizados para expressão heteróloga de proteínas em células de *E. coli* BL21DE3.

Plasmídeo	Proteína Recombinante	Condição de expressão (Temperatura/ Tempo)
pET28a-VirD4 _{HIS-197-355}	VirD4 _{HIS-AAD}	18 °C / 16 hrs
*pET11a-XAC2609 ₃₁₁₋₄₃₁	XAC2609 _{XVIPD}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-1-431}	XAC2609 _{HIS}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{H315A P316A D317A}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{H315A P316A}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{G336W}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{G336W}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{D363A}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{D363A}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{F375A V377A}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{F375A V377A}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{D383A P384A}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{D383A P384A}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{A396M}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{A396M}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{P400A}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{P400A}	37 °C / 3 hrs
pET28a-XAC2609 _{HIS-311-431} ^{S426Ter}	XAC2609 _{HIS⁺XVIPCD} ^{S426STer}	37 °C / 3 hrs
#pET28a-XAC2609 _{HIS-309-431} ^{Q(397-431)A}	XAC2609 _{HIS-HIS-XVIPCD} ^{Q(397-431)A}	37 °C / 3 hrs
#pET28a-XAC2609 _{HIS-309-431} ^{Q(397-431)S}	XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{Q(397-431)S}	37 °C / 3 hrs

Construções sintéticas produzidas pela empresa *GENSCRIPT*, foram substituídos todos os *códons* de Glutaminas por *códons* de Alanina e Serina, entre os resíduos 397- 431 de XAC2609 nos plasmídeos pET28a-XAC2609_{HIS-309-431}^{Q(397-431)A} e pET28a-XAC2609_{HIS-309-431}^{Q(397-431)S}, respectivamente.

3.2.2 Purificação de proteínas heterólogas

Após o período de indução, as culturas foram submetidas à centrifugação (15 min, 4000 g) e as células eram ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (20 mM

de Tris-HCl em pH específico para cada proteína, 25 % (p/v) sacarose). As células foram lisadas com o uso do aparelho *French Press* e centrifugadas (15000 x g, 1 hora, 5 °C). Análises por SDS-PAGE do precipitado e do sobrenadante foram realizadas a fim de verificar a solubilidade da proteína. As construções que apresentam a cauda de poli-histidina N-terminal foram primeiramente purificadas por cromatografia de afinidade empregando uma coluna de Ni⁺² (HiTrap™ Chelating, GE Healthcare) equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl (pH 8), 0,2 M NaCl, 20 mM imidazol e 2 % glicerol. A eluição era feita usando um gradiente de imidazol de 20mM à 500 mM. Após a eluição, o domínio His-VirD4_{AAD} era submetido a clivagem da calda de Histidina N-terminal de acordo com protocolo do kit "*Thrombin CleanCleave*" (Sigma) durante a noite a 4 °C. Ao fim do processo eram verificados se a clivagem estava completa por análise em SDS PAGE 15%. Em seguida, VirD4_{AAD} era submetido a etapa de purificação em coluna de filtração em gel (resina: Superdex 75, coluna: 26/60, GE) em tampão (20 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 2% glicerol). O domínio XVIPCD de XAC2609 (XAC2609_{XVIPD}) clonada em vetor pET11a foi purificada primeiramente em uma coluna de troca aniônica (resina: Q Sepharose Fast Flow, coluna: XK 16/40, GE) em tampão 20 mM Hepes (pH 6,5), 1 mM EDTA, de acordo com o protocolo em Souza (2010). A eluição das proteínas adsorvidas era feita empregando um gradiente de NaCl de 0 até 0,3 M. Em seguida, as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE 18%. As frações contendo XAC2609_{XVIPD} foram submetidas à uma purificação em coluna de filtração em gel (resina: Superdex 75, coluna: 26/60; GE). Na Tabela 12 estão sumarizadas as condições e etapas das purificações descritas nessa Tese.

As massas moleculares das proteínas purificadas foram confirmadas pela técnica de espectrometria de massa em equipamento MALDI TOF/TOF –

UltrafleXtreme (Bruker) em serviço realizado pela Central Analítica (IQ-USP).

Tabela 12. Condições de purificações de proteínas recombinantes

Produto proteico	Etapas Cromatográficas	Tampões Utilizados
VirD4 _{HIS-AAD}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
	Cromatografia de filtração em gel S75	Tp D: 20mM Tris pH8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol
XAC2609 _{XVIPCD}	Q-sepharose	Tp. C: 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5, 1 mM EDTA; Tp. D: Tp. C + 300 mM NaCl
	Filtração em gel S75	Tp E: 20 mM Tris-HCl pH7; 100mM NaCl
XAC2609 _{HIS}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{H315A} P316A	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{G336W}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{D363A}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{F375A} V377A	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{D383A} P384A	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{A396M}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{P400A}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{S426Ter}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-309-431} ^{Q(397-431)A}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0
XAC2609 _{HIS-XVIPCD} ^{Q(397-431)S}	Cromatografia de afinidade	Tp. A: 20mM Tris pH8.0, 20mM Imidazol pH 8.0; 200mM NaCl; 2% glicerol. Tp. B: Tp A+ 500 mM Imidazol pH 8.0

O procedimento de co-purificação do complexo VirD4_{HIS-AAD}-XAC2609_{XVIPCD} foi realizado a partir de 500 mL de cultura de células de expressando VirD4_{HIS-AAD} e 1500 mL de células expressando XAC2609_{XVIPCD}. As culturas induzidas de VirD4_{HIS-}

AAD e $\text{XAC2609}_{\text{XVIPCD}}$ foram misturadas e submetidas à centrifugação (15 min, 4000 x g) e as células foram ressuspensas em 40 mL de tampão de lise (20 mM de Tris-HCl com pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM). As células foram lisadas com o uso do aparelho *French Press* e centrifugadas (15000 x g, 1 hora, 5 °C). O complexo $\text{VirD4}_{\text{HIS-AAD-XAC2609XVIPCD}}$ foi primeiramente purificado por cromatografia de afinidade empregando uma coluna de Ni^{+2} (HiTrap™ Chelating, GE Healthcare 5mL) equilibrada com tampão A (20 mM de TrisHCl, pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM). Após aplicação da amostra, lavou-se a coluna com 100 mL de tampão A. A eluição do complexo foi realizado usando um gradiente de 20 à 500 mM imidazol. Visto que apenas $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$ apresenta a cauda de poli-histidina N-terminal, objetiva-se que $\text{XAC2609}_{\text{XVIPD}}$ permaneça na coluna de níquel mediante somente à interações realizadas com $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$. Após análise por SDS-PAGE das frações eluídas, seguia-se uma etapa de diálise por 12 horas em tampão (20 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl). Após a diálise a amostra era concentrada para um volume final de 10 mL e seguidamente submetida a uma fase de purificação por técnica de cromatografia de exclusão molecular (resina: Superdex 75, coluna: 26/60, GE). As frações eluídas nesta segunda fase de purificação foram analisadas por SDS-PAGE e ensaios por Western-Blot com anticorpos anti-cauda poli-histina (Sigma) a fim de detectar $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$ e anti-XAC2609 (obtido em trabalho anterior do nosso grupo, Souza (2010)).

3.2.3 Trocas de tampão, concentração e quantificação de proteínas

Após as etapas de purificações as amostras eram submetidas a trocas de tampões de acordo com o experimento que seriam submetidas. Eram feitas etapas de diálise com trocas de cada 12 hrs (5°C, sob agitação), etapas de purificação por

exclusão molecular gel filtração (resina: Superdex 75, coluna: 26/60, GE) ou com o uso de colunas PD-10 (GE) com o tampão adequado com o experimento. Após, as amostras eram concentradas em tubos "Amicon-Ultra" (Millipore) e as concentrações molares eram avaliadas pela absorbância a 280 nm (Pace et al. 1995) e pelo método de Lowry modificado de quantificação de proteínas (Hartree 1972).

3.3. Caracterização de proteínas e das Interações proteína-proteína

3.3.1 Experimentos de Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos (SAXS)

A técnica de SAXS foi utilizada para obter informações estruturais, de flexibilidade e grau de oligomerização dos domínios de VirD4_{AAD}, XAC2609_{XVIPCD} e do complexo copurificado de VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} em solução. Os experimentos de SAXS foram coletados na linha SAXS 2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O comprimento de onda de radiação era 1,55 Å e o espalhamento de raios-X foi coletado utilizando detector MAR CCD 165 (MAR Research) a uma distância de 935,5 mm da amostra. A distância da amostra ao detector foi ajustada para um intervalo do vetor de espalhamento entre $0.016 < q < 0.356 \text{ Å}^{-1}$, onde $q = (4\pi/\lambda) \cdot \sin\theta$ (θ é o ângulo de espalhamento, λ é o comprimento de onda do feixe espalhado (1.55Å)). Na Figura 17, está ilustrado um experimento geral de SAXS onde soluções de macromoléculas são expostas a um feixe de raio-X e então a intensidade espalhada é registrada pelo detector em função do ângulo de espalhamento 2θ . As amostras de VirD4_{AAD}, XAC2609_{XVIPCD} e do complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 2 % glicerol foram medidas em um porta amostra formado por duas janelas de mica com caminho ótico de 1 mm e o padrão de espalhamento foi coletado por 300 s. Foram

utilizadas 3 concentrações distintas para cada amostra. Foram feitas leituras separadas do tampão da amostra e de proteínas em solução tampão. A partir disto, das intensidades da curva de SAXS da amostra (proteína + tampão) foram subtraídas a intensidade do tampão. O pacote Atsas (Petoukhov et al. 2012) foi usado para a análise dos dados. A função de distribuição de distâncias $P(r)$ foi gerada por GNOM (Svergun 1992). Vinte envelopes de baixa resolução para VirD4_{AAD} foram gerados usando DAMMIF (Franke and Svergun 2009). Os vinte envelopes criados foram alinhados e sobrepostos utilizando o programa DAMAVER (Volkov and Svergun 2003) e o mapa de probabilidade dos modelos representativos foi filtrado com o programa DAMFILT, gerando os modelos *ab initio* finais para VirD4_{AAD}. As análises do raio de giro e flexibilidade foram feitas a partir das interpretações dos gráficos de Guinier e Kratky, respectivamente. As estimativas de massa molecular por SAXS (Mylonas et al. 2007) dos componentes foram realizadas utilizando como referencial a intensidade de espalhamento $I(0)$ da lisozima de ovo de galinha (HEWL).

Figura 17. Representação esquemática de um típico experimento por SAXS. Amostras de proteínas e tampão são seguidamente submetidas a exposição frente a um feixe de raio-X. A quantidade de luz difratada diretamente no detector é integrada em função do ângulo de espalhamento 2θ . A integral da quantidade de luz detectada em função do vetor q de espalhamento produz como resultado a curva de espalhamento de SAXS. As curvas de espalhamento das proteínas e tampão são subtraídas e então é obtida a curva de espalhamento da amostra pura (amostra-

tampão). Figura modificada de (Skou et al. 2014).

3.3.2 Experimentos de Dicroísmo Circular (CD)

Experimentos de CD fornecem informações sobre o tipo de estrutura secundária predominante ao longo da cadeia polipeptídica (Greenfield 2006b). Estruturas de α -hélices são caracterizadas por apresentarem duas bandas negativas em 222 nm e 208 nm e uma positiva em 185 nm (HOLZWARTH and DOTY 1965). Folhas β pregueadas apresentam uma banda negativa de 218 nm e uma positiva em 195 nm (Greenfield and Fasman 1969). Proteínas desordenadas apresentam elipsidade mínima próxima de 200 nm e bandas negativas em 195 nm (Tiffany and Krimm 1969; Venyaminov SYu et al. 1993). Na Figura 18, está ilustrado um exemplo do padrão espectral de dicroísmo circular das estruturas discutidas acima.

Figura 18. Dicroísmo circular de estruturas secundárias comumente presente em proteínas. Linha amarela (α -hélice), linha azul (folhas β pregueada) e linha vermelha (estrutura desordenada). Figura adaptada de Dodero et al. 2011.

Ensaio de desnaturação térmica monitorados por CD são utilizados para monitorar mudanças conformacionais induzidas pelo aumento da temperatura (Greenfield 2006a). Em geral, infere-se que mudanças na estrutura secundária são detectadas a partir de uma variação na elipsidade residual, particularmente em 222 nm para α -hélices e 215 nm para folhas- β .

Os ensaios de desnaturação térmica monitorados por CD foram realizados em um espectropolarímetro Jasco 815 e cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 mm. Amostras purificadas de XAC2609_{XVIPCD} na concentração de 15 μ M em tampão (1 mM Tris-HCl, pH 7, 5 mM NaCl) foram monitoradas entre 190 nm e 260 nm nas temperaturas de 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C e 90 °C. Foram realizadas 3 acumulações de 20 nm por minuto para cada temperatura de ensaio. A rampa de desnaturação térmica foi de 0,5 °C por minuto. A elipsidade molar residual é descrita como: $[\theta]$ ((deg x cm²/dmol)/número de aa-1) (Greenfield 2006b) .

Também, foram realizados ensaios de CD a 25 °C com amostras purificadas de XAC2609_{HIS-XVIPCD} e XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} em concentrações de 15 μ M em tampão (5 mM Tris-HCl, pH8, 5 mM NaCl, 100 μ M EDTA). Foram realizadas 5 acumulações de 20 nm por minuto entre os comprimentos de onda de 190 nm e 260 nm.

3.3.3 Experimentos Analíticos de Cromatografia de Exclusão Molecular

Os experimentos de caracterização de VirD4_{AAD} e XAC2609_{XVIPCD} por cromatografia líquida de exclusão molecular foram realizados com uma coluna analítica (HR 10 / 30) de Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences). As proteínas foram eluídas com velocidade de 0,2 mL/min. Foram monitoradas absorção

em comprimentos de onda de 280 nm e 220 nm com o uso do aparelho FPLC ÄKTA (GE). A coluna pré-equilibrada com tampão (20 mM Tris-HCl, pH7, 100 mM NaCl) foi calibrada com padrões de pesos moleculares (Sigma) incluindo albumina (66 KDa), anidrase carbônica (29 KDa), citocromo C (12,4 KDa) e aprotinina (6,5 KDa). Amostras (100 microlitros) de VirD4_{AAD} e XAC2609_{XVIPCD} e do complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} em tampão (20 mM Tris-HCl, pH7, 100 mM NaCl) foram aplicadas separadamente. As concentrações utilizadas foram de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL e 2mg/mL para os padrões moleculares de calibração, VirD4_{AAD} e XAC2609_{XVIPCD} e complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD}, respectivamente.

3.3.4 Ligação cruzada com glutaraldeído

Amostras purificadas de XAC2609_{XVIPCD} e VirD4_{AAD} em tampão (10mM fosfato, pH 8, 100 mM NaCl e glicerol 3%) foram submetidas à ensaios de interação de ligação cruzada por glutaraldeído. Os ensaios foram realizados a 25 °C e com volume final de reação de 30 µL. As amostras foram equilibradas por 20 minutos na temperatura de reação anterior a adição de glutaraldeído. Foram realizados testes variando o tempo de reação (10 e 20 minutos) com concentração de glutaraldeído fixa de 0,02%. As concentrações de proteínas utilizadas de VirD4_{AAD} e XAC2609_{XVIPCD} foram respectivamente, 30 µM e 15 µM. Após o tempo de reação, eram adicionados 10 µL de tampão amostra 4X (150 mM Tris-HCl, pH 7, 12% SDS, 6% β-mercaptoetanol, 30% glicerol, 0,005% Coomassie Blue G-250). Os resultados foram visualizados em SDS-PAGE 16%.

3.3.5 Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Produção de proteínas isotopicamente marcadas com ^{15}N e ^{13}C

Para realização de experimentos bidimensionais do tipo ^{15}N -HSQC, que correlaciona as frequências de ligações N-H presentes ao longo da cadeia polipeptídica da proteína, os domínios VirD4_{AAD} e XAC2609_{XVIPCD} foram marcados isotopicamente com nitrogênio ^{15}N . Para estudar a estrutura secundária e aspectos de interação da cadeia principal, VirD4_{AAD} foi duplamente marcado com ^{15}N e ^{13}C em meio mínimo M9. Para isso, células transformantes de *E. coli* BL21DE3 foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 20 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 50 mM Na_2HPO_4 , 20 mM KH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 2 mM MgSO_4 , 20 mM de ^{12}C -Glicose ou ^{13}C -Glicose, 0,1 mM CaCl_2 e antibióticos adequados. Os parâmetros de temperatura e volume de indução, com exceção do meio utilizado, foram os mesmos descritos no tópico 3.2.3. Os lisados bacterianos contendo ^{15}N -VirD4_{AAD} e $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirD4_{AAD} foram submetidas as etapas de purificação por cromatografia de afinidade, clivagem da cauda N-Terminal de Histidina por trombina e purificação por cromatografia de exclusão molecular, tal como descrito no tópico 3.2.3. O lisado bacteriano de ^{15}N -XAC2609_{XVIPCD} foi submetido a etapas de purificação por cromatografia de troca iônica e exclusão molecular tal como descrito no tópico 3.2.3. Após, as amostras foram dialisadas em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 % (v/v) glicerol. Os experimentos de RMN foram adquiridos na Central Analítica do IQ/USP, em um espectrômetro Bruker Ascend operando a 800 MHz, equipado com uma sonda criogênica para tubos de 5 mm.

Titulações proteína-proteína monitorados por RMN

As coletas dos dados, processamento e análise dos espectros foram feitos com as colaborações da Dra. Luciana Coitinho de Oliveira, Dr. Diorge e o Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas. Os ensaios foram realizados com ^{15}N -XAC2609_{XVIPCD} e ^{15}N -VirD4_{AAD} a 150 μM , 25 °C em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 % (v/v) glicerol, 7 % (v/v) D₂O, 0,05 % (p/v) NaN₃, 1 mM TSP e inibidor de protease P8465 (Sigma) em concentração recomendada pelo fabricante. Alíquotas de 30 μM de ^{14}N -XAC2609_{XVIPCD} e ^{14}N -VirD4_{AAD} foram adicionadas durante as titulações, até concentrações finais de 300 μM e 150 μM das proteínas não marcadas, respectivamente. Os espectros de RMN foram processados utilizando os programas NMRPipe/NMRDraw (Delaglio et al. 1995), com multiplicação dos FIDs (*free induction decays*) por função de janela cossenoidal (“sine-bell”) e preenchimento com zeros (“zero filling”) dobrando o número de pontos. A visualização e análise dos espectros de ^{15}N -HSQC foram realizadas utilizando o programa CCPN Analysis (Vranken et al. 2005).

Assinalamento de frequência de ressonâncias de ^{15}N e ^{13}C da cadeia principal

As coletas dos dados e os processamentos dos espectros foram feitos com a colaboração do Professor Dr. Roberto Kopke Salinas. A amostra de $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -VirD4_{AAD} (2 mM) em tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 50 mM NaCl, 2 % (v/v) glicerol, 7 % (v/v) D₂O, 0,05 % (p/v) NaN₃, 1 mM TSP e inibidor de protease P8465 (Sigma) em concentração recomendada pelo fabricante foi submetida a experimentos 2D (^{15}N -HSQC) e 3D (HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB e

CBCA(CO)NH) a 35 °C. Os espectros de RMN foram processados utilizando os programas NMRPipe/NMRDraw (Delaglio et al. 1995). O assinalamento e análise dos deslocamentos químicos da cadeia principal foram realizados com o uso do programa CCPN Analysis (Vranken et al. 2005). A estrutura secundária da cadeia principal de VirD4_{AAD} foi estimada usando o software DANGLE (*Dihedral ANgles from Global Likelihood Estimates*) (Cheung et al. 2010).

3.3.6 Titulação monitorada por calorimetria isotérmica (ITC)

Titulação de proteínas monitoradas por calorimetria isotérmica é uma técnica biofísica amplamente utilizada para se obter os valores termodinâmicos da constante de dissociação (K_d) e de entalpia de ligação (ΔH) (Perozzo et al. 2004; Velazquez-Campoy et al. 2004). O experimento de ITC é realizado pela injeção gradual de um ligante (A) em um reservatório no qual se encontra o outro ligante (B). O calor absorvido ou liberado decorrente da interação entre A e B é determinado pela quantidade de energia necessária para manter constante a diferença de temperatura entre a cela de referência e a cela de reação.

Os experimentos de titulação foram realizados com o aparelho VP ITC (MicroCal^{TM}) a 25 °C no laboratório da Profa. Iolanda Cuccovia do IQ-USP. As amostras de VirD4_{HIS-AAD} (10-15 μ M) e construções do domínio XVIPCD de XAC2609 (100-150 μ M) (His-XAC2609, XAC2609_{HIS-XVIPCD}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{H315AP316AD317A}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{G336W}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{D363A}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{F375AV377A}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{D383AP384A}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{A396M}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{P400A}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{S426Ter}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{PoliA}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{PoliS}) em tampão 20 mM Tris, pH 8, 200 mM NaCl e 2% (v/v) glicerol foram adicionadas no reservatório e

seringa, respectivamente. Tipicamente, eram realizadas uma injeção inicial de 0.5 μ L seguidas de injeções de 5 a 10 μ L em intervalos de 5-10 minutos entre cada injeção até o final da titulação. As amostras foram também tituladas em tampão para subtração do calor de diluição. A integral das curvas de calor em função do tempo da constante de dissociação e entalpia molar de ligação foi realizada com o software *Origin Microcal*.

3.4. Ensaios microbiológicos e funcionais de *X. citri*

3.4.1 Cultivos celulares e curvas de crescimentos

Tipicamente, as células de *X. citri* eram retiradas de estoques a -80 °C e plaqueadas em meio LB (5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona, 10 g/L NaCl pH 7,5.) agar 1,5% por 48 horas. Em seguida eram realizados pré-inóculos em meio 2x TY (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl) por 12 horas ou *overnight*. Após, as culturas eram diluídas até D.O._(600nm) 0,05 e incubadas por 12 horas a 30 °C e 200 rpm de agitação. Cepas de *X. citri* que continham os vetores pBBR e/ou pBRA eram cultivadas em meio suplementado com antibióticos gentamicina (20 μ g/mL) e/ou espectinomicina (100 μ g/mL), respectivamente.

As curvas de crescimento de *X. citri* foram realizadas a partir da normalização dos inóculos para D.O._(600nm) 0,05 em 50 mL de 2x TY. Foram retiradas alíquotas de 500 μ L a cada 3 horas de cultivo para quantificar a D.O._(600nm) e a cada 6 horas eram realizadas estimativas de CFU (unidades de formação de colônias) por diluições seriadas seguida de plaqueamento em meio LB agar.

Colônias isoladas de *Escherichia coli* BL21(DE3) *Artic Express* eram crescidas

tipicamente por 12 horas em meio 2x TY suplementado com antibióticos gentamicina (20 µg/mL) e espectinomicina (100 µg/mL) a 30°C anterior aos experimentos de competição contra *X. citri* e ensaios de secreção dependente do T4SS.

3.4.2 Ensaios de competição bacteriana

Culturas de *Escherichia coli* BL21(DE3) Artic Express e cepas de *X. citri* foram crescidas de acordo com metodologia descrita no tópico 3.4.1. Após 12 horas de crescimento, os inóculos foram normalizadas em meio 2xTY para $D.O._{(600nm)} = 2,0$. Para avaliar o crescimento celular na condição de sem contato, estendeu-se uma membrana de polycarbonato (Whatman® Nuclepore Track-Etched) com poros de 0.2 µm sobre um volume de 50 µL de cultura de *E. coli* espalhado em cima de um aplaca de LB agar 1,5%. Em seguida foram adicionados 2 µL de cada cepa de *X. citri* ao longo da superfície da membrana. Para testar a condição de contato, foi realizada uma mistura celular *E. coli* : *X. citri* na proporção 1:1 e foram aplicados 2 µL de cada mistura competição ao longo da superfície da membrana de polycarbonato em cima de uma placa de LB-agar. As culturas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e as imagens foram registradas com o uso do transluminador (SAFE IMAGER 2.0 INVITROGEN). Competições entre *X. citri* e *E. coli* eram também realizadas diretamente em meio LB agar 1,5% suplementado com antibióticos adequados.

Em adição, com foram utilizadas cepas de *E. coli* DH5 *alpha* expressando o gene *lacZ*, em competições contra *X. citri* em meio de cultura 2x TY contendo IPTG (50µM) e X-gal (80µg/mL). Nessas condições, colônias de *E. coli* adquirem coloração azulada devido clivagem da X-gal pela proteína β-galactosidase. Essa metodologia foi adaptada para o T4SS de *X. citri* a partir de ensaios de competição bacterianas entre *Pseudomonas aeruginosa* via T6SS e *E. coli* como descrito por

(Hachani et al. 2013).

3.4.3 Western Blot

Inóculos de *X. citri* eram concentrados para um D.O._(600nm) = 50 em tampão de amostra de SDS PAGE (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,01 % (p/v) azul de bromofenol, 18,7 % (v/v) glicerol, 140 mM 2-mercaptoetanol e 3,7 % (p/v) SDS) e fervidas por 10 minutos. Eram aplicados 10 microlitros em gel Tricina-SDS PAGE 16% (Schägger 2006). Ao fim da corrida do gel, as proteínas eram transferidas para membranas de nitrocelulose com o uso de uma cuba de transferência semi-seca (TE 70 PWR, GE Healthcare) com corrente de 60 mA por 1 hora de transferência. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose eram incubadas em solução de bloqueio (tampão TBS + 10% leite em pó) por um período de 2 a 12 horas a 4 °C. Foram feitas incubações com anticorpos primários Anti-XAC2609, Anti-XAC2610 ou Anti-VirB7. Os anticorpos primários eram diluídos 1000x em tampão (TBS, 10% leite em pó) e as membranas eram incubadas ao longo de 1-2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Após, as membranas eram lavadas cinco vezes com 10 minutos de incubação em tampão (TBST 0,05%) com agitação. Em seguida, as membranas eram incubadas com solução de anticorpo secundário (IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L); 1:25000; 1 hora, TBS) e lavadas por quatro vezes por dez minutos com tampão TBS. As imagens de detecção por imunofluorescência no infravermelho foram obtidas pelos escaneamentos das membranas com ODYSSEY® CLx.

3.4.4 Ensaio de secreção de XAC2609 dependente do T4SS

A metodologia do ensaio de secreção de XAC2609 dependente do T4SS descrita nessa parte do trabalho foi feito como descrito no Anexo I desta tese (Souza et al. 2015). Culturas de *Escherichia coli* BL21(DE3) *Artic Express* e inóculos de *X. citri* foram crescidos como descrito no tópico 3.4.1. Ao final do crescimento, as culturas foram normalizadas em meio 2x TY para $D.O._{(600nm)} = 2,0$. As culturas de *X. citri* e *E. coli* foram então misturadas em microtubos em uma proporção 1:1. Alíquotas de 5 μ L das culturas (puras e misturas) foram dispostas sobre membrana de nitrocelulose e incubadas sobre meio LB agar 1,5% por 12 horas a 30 °C suplementados com antibióticos gentamicina (20 μ g/mL) e espectinomicina (100 μ g/mL). Após o tempo de incubação, as membranas eram lavadas em água corrente por 2 minutos para retirar as células. As membranas eram incubadas por 2 horas em solução de bloqueio (TBS pH 7,5 ; Leite desnatado 10%) e em seguida incubadas com solução de anticorpo primário anti-XAC2609 1:1000 (TBST 0,005%, pH 7,5, leite desnatado 5%, extrato de *E. coli*) por 2 horas e lavadas 4x10 minutos com TBST. Em seguida, membranas eram incubadas com solução de anticorpo secundário (IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L); 1:25000; 1 hora, TBST) e lavadas por 4x10 minutos com TBS. As imagens de detecção por imunofluorescência no infravermelho foram obtidas pelos escaneamentos das membranas com ODYSSEY® CLx.

Adicionalmente neste ensaio, foi implementado um controle positivo de detecção *in situ* de XAC2609. Células de *X. citri* após o crescimento por 12 horas a 30 °C sobre membrana de nitrocelulose, foram tratadas com tampão de lise (NaOH 200 mM 1% SDS) por 2 minutos. Em seguida as membranas eram tratadas de

acordo com o procedimento padrão do ensaio de secreção.

3.4.5 Ensaio de transparência de colônias e viabilidade

Inóculos de *X. citri* foram crescidos tal como descrito no tópico 3.4.1. Após, os inóculos foram normalizados para D.O._(600 nm) 0,05 e colônias de *X. citri* foram crescidas a partir de alíquotas de 10 µL dos inóculos normalizados para D.O._(600 nm) 0,05 em meio LB agar 1,5% a 30 °C. Os crescimentos foram monitorados ao longo de 96 horas de cultivo. Para evidenciar o efeito de transparência, a cada 24 horas de cultivo, as placas de cultivo foram fotografadas sobre uma folha de papel sulfite que estava impressa a uma *FIGURA*. Para evidenciar a viabilidade celular ao longo do tempo, eram realizadas contagem em CFU/mL das colônias a cada 24 horas de crescimento. Neste procedimento, as colônias eram excisadas a partir das placas de cultivo e então ressuspendidas em 1 mL de meio 2x TY que eram então contadas por diluições seriadas em meio LB agar 1,5%. Todos os meios de cultura apresentavam antibióticos ampicilina (50 µg/mL) e espectinomicina (100 µg/mL).

3.4.6 Ensaio de formação de biofilme bacteriano

O biofilme bacteriano é composto por uma matriz de bactérias, DNA extracelular, polissacarídeos e proteínas (Dunger et al. 2016). Em *X. citri*, é possível observar um biofilme maduro a partir de 5 dias de cultivo em câmaras microbiológicas (Dunger et al. 2016).

Para realizar ensaios de formação de biofilme, inóculos de *X. citri* foram

crescidos tal como descrito no tópico 3.4.1. Esta parte do projeto foi realizada em colaboração com o Dr. Ricardo German Dunger. Após o crescimento, as células foram normalizadas para D.O.₍₆₀₀₎ de 0,05 e incubadas ao longo de 5 dias a 28 °C em câmara de microscopia laminada. As imagens de Biofilmes foram adquiridas com uma objetiva de aumento 100x (CFI Plan Apo Lambda 100XH), e filtro de fluorescência para GFP (GFP-3035B, Semrock). Foram realizados coletas de imagens ao longo de 30 µm em passos de 0,5 µm de comprimento a partir da base da lamínula ao longo do eixo Z. Os empilhamentos das imagens foram realizados com o uso dos softwares FIJI (Schindelin et al. 2012) e NIS-Elements Viewer (NIKON). Análises de viabilidades celulares (UFC / mL) foram realizadas por técnica de diluição seriada foram avaliadas nos tempos iniciais e finais dos experimentos.

3.4.7 Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET)

A técnica de MEV é utilizada para caracterizar aspectos estruturais ao longo da superfície de materiais e células. Experimentos de MEV foram realizados com a cepa selvagem de *X. citri* e a cepa nocaute *X. citri* ΔXAC2610. Inóculos de *X. citri* foram crescidos tal como descrito no tópico 3.4.1. Após o crescimento dos inóculos, as culturas foram pipetadas sobre uma lâmina *thermanox* (Nunc^{TM}) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente e lavadas com tampão fosfato (pH 7). A primeira etapa de fixação celular foi realizada com a adição de solução de glutaraldeído 2,5 %. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma segunda etapa de fixação por tetróxido de ósmio, desidratação gradual por etanol, tratamento de ponto crítico por CO₂ e recobrimento com ouro. Os experimentos de aquisição de imagens foram

realizados no microscópio de varredura JEOL JSM-7401F (Central Analítica IQ-USP) com magnificação de 40.000x e tensão de aceleração de voltagem de 5KV.

A técnica de MET foi realizada com o objetivo de investigar possíveis diferenças morfológicas entre *X. citri* e a cepa nocaute $\Delta xac2610$ ao longo do envelope bacteriano de *X. citri*. Esta parte do projeto foi realizada com a colaboração do, Dr. Ricardo German Dunger, Dr. Diorge Paulo de Souza e do Professor Dr Li-Sei Watababe. Inóculos de *X. citri* foram crescidos tal como descrito no tópico 3.4.1. Após os crescimentos dos inóculos, as culturas foram centrifugadas em microtubos (5000 x g, 5 minutos, temperatura ambiente) e os sobrenadantes foram descartados. As lavagens das células foram realizadas através da adição de 1 ml de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4) em cada amostra. Após 15 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (6500 rpm, 5 minutos) e o sobrenadante retirado. A etapa de fixação foi realizada com a adição de 1 mL de solução de Karnovsky modificada (2,5 % glutaraldeído, 2 % paraformaldeído, tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4). As amostras foram incubadas por 90 minutos na temperatura ambiente e centrifugadas (5000 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e então foi realizada mais uma etapa de lavagem com tampão fosfato (0,2M, pH 7,4, 15 minutos). Uma segunda etapa de fixação foi realizada com a adição de 1 mL de solução de tetróxido de ósmio 1% e as amostras foram incubadas por 1 hora no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 2 minutos, temperatura ambiente) e lavadas com água. Os *pellets* das amostras foram dissociados dos microtubos com o uso de um bastão de vidro. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução aquosa 0,5% de acetato de uranila em cada amostra e cumpriu-se um período de incubação de 1 hora a temperatura ambiente na ausência de luz. Após o período de incubação, o acetato de uranila foi retirado com o uso de

uma micropipeta e foi adicionado 1 mL de solução de etanol 60% em cada amostra. Foram realizadas incubações sucessivas com soluções crescentes de etanol (etanol 70 %, 80 %, 90 %, 95 % e 100 %). Entre cada troca de solução, as amostras eram incubadas por 5 minutos na temperatura ambiente. Após a ultima etapa de desidratação com etanol 100 %, foi adicionado 1 mL de solução de óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences) e seguiu-se uma incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Foram realizadas 3 repetições de incubações e lavagens com oxido de propileno. Em seguida, as amostras foram submetidas a 4 trocas sucessivas de soluções de oxido de propileno e resina para microscopia (Low Viscosity embedding Kit (#14300), Spurr's) nas proporções de 1:1, 1:3, 0:1 e 0:1 (oxido de propileno:resina) com tempos de incubações de respectivamente, 40 minutos, 90 minutos e 12 horas e 72 horas. As 3 primeiras etapas de incubações (1:1;1:3 e 0:1) foram realizadas com agitações brandas a temperatura ambiente. A quarta de etapa de incubação foi realizada a 60 °C sem agitação com o objetivo de solidificar a resina. Após a solidificação da resina, foram realizados cortes histológicos e ultrafinos das amostras. Os cortes foram coletados em telas de 200 *mesh* e armazenados em porta amostras de microscopia eletrônica. Os experimentos de aquisição de imagens foram realizados com um microscópio de transmissão MET JEOL JEM 2100 (Central Analítica IQ-USP).

3.4.8 Ensaios de Microscopia de Contraste de Fase e de Fluorescência

Inóculos de *X. citri* foram crescidos tal como descrito no tópico 3.4.1. Após, os inóculos foram normalizados para D.O._(600 nm) 0,05 e colônias de *X. citri* foram crescidas a partir de alíquotas de 10 µL dos inóculos normalizados para D.O._(600 nm)

0,05 em meio LB agar 1,5% a 30 °C. Os crescimentos foram monitorados ao longo de 96 horas de cultivo. A cada 24 horas de cultivo, as células das colônias eram retiradas com o uso de um palito e ressuspensas em microtubos com meio 2x TY suplementado com iodeto de propídeo (IP) (1 µg / mL) e imediatamente seguiam as visualizações no microscópio. As culturas foram observadas um microscópio Nikon Eclipse Ti equipado com filtros para GFP (GFP-3035B-000-ZERO, Semrock) e IP (TxRed-4040B, Semrock) e lente objetiva Nikon APO 100x.

Inóculos de *X. citri* selvagem e $\Delta xac2610$ pBRAΦ GFP eram também tipicamente visualizados por microscopia de contraste de fase após o crescimento em meio 2x TY a 30°C. As células eram monitoradas ao longo de 12 horas em cameras microbiológicas contendo meio LB agar. Imagens eram coletadas a cada 10 minutos. As imagens eram visualizadas com o uso dos softwares FIJI (Schindelin et al. 2012) e NIS-Elements Viewer (NIKON).

3.5. Análises de Bioinformática

3.5.1 Análise de sequência da família das XVIPCDs

As sequências primária das doze XVIPCDs presentes no genoma de *X. citri* tal como descrita no trabalho (Alegria et al. 2005) foram alinhadas com o uso do software Clustal Omega (Sievers et al. 2011) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) utilizando os parâmetros padrões do programa. O resultado do alinhamento das doze XVIPCDs foi utilizado como entrada no software HMMER (Finn et al. 2011), com o modo de busca Jackhmmer

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/jackhmmer>) e o banco de dados de busca utilizado foi o "*UniProt reference proteomes*". Após a conversão dos resultados de iteração, as sequências dos XVIPCDs foram alinhadas com o software Clustal Omega, os *gaps* baseados na sequência de XAC2609 XVIPCD foram retirados. Este resultado foi utilizado como entrada no software WebLogo (Crooks et al. 2004). Também tipicamente eram feitas buscas utilizando a sequência primária da proteína de interesse com Jackhmmer (Finn et al. 2011), os *hits* das sequências identificadas eram novamente alinhados com o programa Clustal Omega (Sievers et al. 2011) e referenciados pela primeira pela sequência da lista para retiradas dos *gaps*, os alinhamentos eram submetidos e para o site WebLogo (Crooks et al. 2004)

3.5.2 Análise de proteínas por bioinformática

As predições de massa molecular, composição de aminoácidos, ponto isoelétrico e de absorvidade à 280 nm para quantificação de proteínas foram feitas com o uso do software PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>). Predições de estrutura secundárias e terciárias foram feitas com os softwares PSIPRED (Buchan et al. 2013) e I-TASSER (Zhang 2008), Phyre2 (Kelley et al. 2015). Predições de localização celular e de sinal de lipidação foram feitas com os softwares DOLOP (Babu et al. 2006), e SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011). Análises de desordem de sequências foram feitas com diferentes softwares disponíveis no web site: <http://genesilico.pl/metadisorder/> (Kozlowski and Bujnicki 2012). Para a identificação de domínios conservados foram utilizados os bancos de dados PFAM (Finn et al. 2016) e de domínios conservados do NCBI (CDD)

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das cepas de *X. citri* com nocautes nos genes *xac2611*, *virB5* e *virB11*

4.1.1 *virB5* e *virB11* são essenciais para o funcionamento do T4SS de *X. citri*

Na Figura 19 está um resultado exemplificando uma competição de colônias entre células de *X. citri* e *E. coli*. Células de *X. citri* expressando proteína GFP e *E. coli* (ausente de fluorescência) foram co-cultivadas em meio LB-agar ao longo de 24 horas (Souza et al. 2015) sobre filtro de nitrocelulose em meio LB agar. Através desses co-cultivos celulares foi possível identificar que as células de *X. citri* que codificam um T4SS funcional (*X. citri* selvagem (Wild type), $\Delta virD4 + virD4$ e $\Delta virB7 + virB7$) inibem o crescimento de *E. coli*, isso foi constatado devido a um grande efeito de fluorescência de GFP nas competições envolvendo estas cepas. Por outro lado, competições envolvendo as cepas nocautes do T4SS de *X. citri* ($\Delta virD4$ e $\Delta virB7$) são dominadas pelo crescimento de células de *E. coli*, e ao final da competição não é observada fluorescência de GFP nestas colônias. Portanto, foi observado que o T4SS confere vantagem adaptativa para *X. citri* quando em co-cultura com células competidoras. Experimentos de competições de colônias utilizando essa mesma metodologia também foram empregados no trabalho de Oliveira et al. 2016 (AnexoII).

Figura 19. Ensaio de competição de colônias entre *X. citri* GFP e *E. coli*, indicando que um T4SS funcional confere vantagem adaptativa para *X. citri*. Figura modificada (Supplementary Figure 6) do trabalho de Souza et al. 2015 (Anexo I). Cepas de *X. citri* expressando GFP, *X. citri* selvagem de (Wild type), e cepas de *X. citri* nocautes de *virD4* ($\Delta virD4$), *virB7* ($\Delta virB7$), e cepas de *X. citri* nocautes de *virB7* complementada com *virB7* ($\Delta virB7 + virB7$) e nocaute de *virD4* complementada com *virD4* ($\Delta virD4 + virD4$). Em todas as competições foi utilizado a cepa *Escherichia coli* B121(DE3) Artic Express.

Em (Alegria et al. 2005) foi levantada a hipótese de que o gene *xac2613* poderia corresponder ao gene *virB5*. Essa hipótese foi baseada na localização desse gene dentro do *locus* cromossomal do T4SS, aspectos de predição de estrutura secundária e de PI para o produto proteico codificado por este gene. Nota-se que VirB5 está associada a se localizar na extremidade do pílus e seja importante para o reconhecimento da célula-alvo (Aly and Baron 2007). Visto esses fatos, decidimos nocautear o gene *xac2613* (*virB5*) a fim de verificar sua possível importância para a função do sistema. VirB11 é uma ATPase citoplasmática e sua função está associada a energizar montagem do pílus e a via de secreção dos substratos, porém alguns T4SSs não necessitam de VirB11 para o funcionamento (Alvarez-Martinez and Christie 2009). Então, com o objetivo de verificar se essa proteína é essencial para funcionamento do T4SS de *X. citri*, foi construída a cepa de *X. citri* nocaute de *virB11* para ser submetida aos ensaios de competições bacterianas.

Na Figura 20 está uma competição entre cepas de *X. citri* contra a cepa de *E. coli* *DH5α* expressando a β -galactosidase em meio LB agar contendo X-gal. Nessas condições, colônias de *E. coli* *DH5α* adquirem coloração azul devido clivagem da X-

gal pela proteína β -galactosidase. Como controle do experimento, foi utilizado a cepa nocaute de *virB7* (*X. citri* $\Delta virB7$), pois sabemos que esta cepa não apresenta a habilidade de inibir o crescimento de *E. coli*. Na Figura 20 observa-se que a coloração nas colônias envolvendo as competições (VS) entre *E. coli* contra as cepas $\Delta virB5$, $\Delta virB11$ e $\Delta virB7$ é predominantemente azul. Isso indica que o crescimento de *E. coli* é dominante contra essas cepas de *X. citri*. Nota-se que a cepa selvagem de *X. citri*, é predominantemente amarela na linha de competição (VS), que é cor natural da colônia de *X. citri* devido a presença do pigmento xantomonadina. Isto indica que *X. citri* selvagem foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli*. A linha indicando os controles negativos (C-) corresponde ao crescimento das *X. citri* isoladas em paralelo ao experimento de competição. No controle negativo (C-) não são observadas diferenças fenotípicas de crescimento ou de tamanho de colônia entre ambas as cepas utilizadas no experimento. Isso indica que o crescimento das cepas *X.citri* $\Delta virB5$, $\Delta virB11$ não é afetado simplesmente devido ao nocaute destes genes. Portanto, conclui-se que a presença de *virB5* e *virB11* são essenciais para o funcionamento do T4SS de *X. citri*.

Figura 20. Ensaio de competição de colônias entre *X. citri* e *E. coli* DH5α expressando β-galactosidase. Competições bacterianas foram cultivadas em meio LB agar contendo X-gal e IPTG sobre filtro. Linha inferior (VS) foram dispostas as competições entre *X. citri* e *E. coli*. Linha superior (C-) culturas de *X. citri* isoladas foram colocadas como controles. A cepa selvagem de *X. citri*, cepa nocaute de *virB5* (*X. citri* Δ*virB5*) e *virB11* (*X. citri* Δ*virB11*) VirB7 (*X. citri* Δ*virB7*) estão dispostas em cada coluna do experimento. A competição foi realizada ao longo de 24 horas sobre filtros com poros em meio LB agar 1,5%, a 30°C contendo, ampicilina (50μg/mL), IPTG (50μM) e X-gal (80μg/mL).

4.1.2 Ensaios de competição bacteriana empregando a cepa nocaute *xac2611*.

XAC2611 é uma proteína de função desconhecida codificada por um gene localizado próximo ao locus cromossomal do T4SS de *X. citri*. A análise de sequência de XAC2611 indica que seja uma proteína de localização periplasmática e sua porção C-terminal codifica um domínio de função desconhecida classificado como DUF4189. Interessantemente, notamos que no mesmo *locus*, o gene *xac2606* codifica um homólogo de XAC2611. Na Figura 21 está o alinhamento de sequência entre XAC2611 e XAC2606 correlacionando o domínio DUF4198, peptídeo sinal e o

sinal de lipidação destas proteínas.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

XAC2606    ---MKLFILLIFLFSSSAAWGQTACPSGVAPGSPQCGPDSGTSRGDIPQPPRPRTGEWLK
XAC2611    MIIIRLASIILLVSWTAPAFATACAGVAPGSPQCGPDSGTSRDDIPTPPRPRTGEWIK
           ::*  ::::  ::  *:.*****:*****:*****:*****:*****:
           :

XAC2606    TWGAIASSD-NGDIGSSTGKLSENEARVEALKVCSDFGNSDCKVNFTYKNQCVAVVQAAK
XAC2611    TWGAIAGSDSTGEAGTAAGELSEDKAKDIAIRRCVNGASDCKINLVYRNQCAALVSTQS
           *****.*. *: *::*:***::*: *:: * * *****:*.:***.*:*.:.

XAC2606    GRTGGKIIISAATEEIIAKKDALDECLKESGAKCYVRGTDCSKPFFRK
XAC2611    DS---FYQGSATKERAILAIGNCKKRSRSGECKVLYSGCSDPIFKKY
           .      .:*** * . *:.* * . .:.* * .:***.*:***:

```

Figura 21. Alinhamento de sequência entre XAC2606 e XAC2611. Características de sequência do peptídeo sinal e do LIPOBOX de Lipoproteínas são indicados por: letras vermelhas (resíduo positivamente carregado); trecho hidrofóbico (letras azuis) e sinal de lipidação (letras verdes) (Babu et al. 2006). Em ciano estão realçadas as regiões correspondentes ao domínio DUF4198 de XAC2606 e XAC2611.

Com o objetivo de obter informações funcionais da XAC2611, e se sua função está associada ao T4SS, foram produzidas as cepas de *X. citri* nocaute de *xac2611* ($\Delta xac2611$), $\Delta xac2611$ complementada ($\Delta xac2611 + xac2611$), cepa selvagens de *X. citri* contendo o vetor pBRA-XAC2611 (*X. citri* Selvagem + *xac2611*) e a cepa Δ VirB7. Essas cepas foram testadas em ensaios de competições bacterianas contra células de *E. coli* expressando β -galactosidase em meio contendo X-Gal e IPTG. Portanto as colônias de *E. coli* apresentam coloração azul quando em alta densidade celular. O vetor pBRA apresenta a região promotora PBAD induzível por arabinose, mas que também exibe um vazamento de expressão mesmo na ausência do indutor em *X. citri*. Na Figura 22 são observados os resultados de competição entre as cepas *X. citri* e *E. coli* após 24, 34 e 48 horas de incubação a 30 °C em meio LB agar suplementado com arabinose e sem arabinose. Neste ensaio, nota-se que a coloração nas competições entre *E. coli* e as cepas $\Delta xac2611 + xac2611$, *X. citri* Selvagem + *xac2611* e Δ VirB7 é predominantemente azul. Logo, a

superexpressão de XAC2611 exerce um efeito negativo sobre a função do T4SS de *X. citri*. E surpreendentemente, nota-se que a cepa *X. citri* Selvagem apresenta uma coloração mais azulada em relação a cepa $\Delta xac2611$ em longos tempos de cultivo (48 horas) em ambas as condições (com e sem arabinose) de competição. Estes resultados sugerem que XAC2611 possa ser um regulador negativo do T4SS.

Figura 22. Competição de bactérias entre *X. citri* e *E. coli* monitorado por atividade de β -galactosidase. *E. coli* DH5 α expressando Betagalactosidase em meio LB agar contendo X-gal e IPTG. As cepas de *X. citri* utilizadas neste ensaio indicadas entre parênteses estão notadas na Tabela 10: *X. citri* Selvagem (*X. citri* Selvagem GFP pBRA Φ), $\Delta xac2611$ (*X. citri* $\Delta xac2611$ GFP pBRA Φ), $\Delta xac2611 + xac2611$ (*X. citri* $\Delta xac2611$ GFP + XAC2611), *X. citri* Selvagem + *xac2611* (*X. citri* Selvagem GFP + XAC2611) e cepa $\Delta virB7$ (*X. citri* $\Delta virB7$ GFP + VirB7). A competição foi realizada ao longo de 24, 34 e 48 horas em meio LB agar 1,5%, a 30°C contendo espectinomicina (100 μ g/mL), ampicilina (50 μ g/mL), arabinose 0,3% e 0% arabinose, IPTG (50 μ M) e X-gal (80 μ g/mL).

Como visto na Figura 22, a cepa $\Delta xac2611$ apresentou uma maior eficiência adaptativa do que a cepa selvagem de *X. citri* em competições de colônias contra *E. coli*. A partir disso, um fator que poderia explicar esse fenômeno seria $\Delta xac2611$ apresentar um maior nível de secreção dos substratos do T4SS. Portanto, foram

realizados experimentos com o objetivo de monitorar os níveis de secreção de XAC2609 utilizando a cepa nocaute $\Delta xac2611$ e a cepa Selvagem de *X. citri* (WT), como controle foram utilizados as cepas *X. citri* nocautes de $\Delta virB7$, $\Delta virD4$ e $\Delta xac2609$.

O ensaio de secreção de substratos mediado pelo T4SS de *X. citri* é baseado na imunodeteção de XAC2609 após o período de competição entre *X. citri* e uma célula-alvo. Tipicamente são realizadas competições entre *X. citri* e *E. coli* sobre membrana de nitrocelulose sobre LB-agar. Nessas competições são utilizadas cepas de *X. citri* selvagem e nocautes do T4SS ($\Delta virB7$, $\Delta virD4$) e cepas nocautes de $\Delta xac2609$ como controles. Após o período de competição, as células são lavadas e tratadas com anticorpos primários anti-XAC2609 e secundários com marcadores de fluorescência. E então o sinal de XAC2609 é detectado sobre a membrana de nitrocelulose nos locais que foram realizadas as competições bacterianas.

Como descrito no capítulo de introdução, um aspecto que é comumente observado por microscopia em competições entre *X. citri* e uma célula-alvo, é um fenômeno "explosão" da célula-alvo de modo dependente do T4SS. Imagens de microscopia que evidenciam esse fenômeno de podem ser acessadas no link disponível no Anexo I desta Tese. A partir disso, uma metodologia desenvolvida ao longo desta Tese para capturar eficientemente as proteínas liberadas para o meio extracelular concomitante ao processo de desintegração da célula-alvo decorrente da atividade do T4SS foi a incubação direta de competições envolvendo *X. citri* e *E. coli* sobre filtros de nitrocelulose.

Figura 23A, foram realizadas co-culturas das cepas de *X. citri* e *E. coli*, lado a lado, ao longo de 12 horas sobre membrana de nitrocelulose sobre meio LB agar 1,5%. Após, o período de competição, as membranas foram lavadas para retirada

das células e incubadas com anticorpos primários anti-XAC2609 e secundários com marcador de fluorescência. Na Figura 23A nota-se que a cepa nocaute de $\Delta xac2611$ secreta maiores níveis de XAC2609 do que a cepa selvagem de *X. citri*. Esse resultado é evidenciado devido a uma maior intensidade de sinal (unidade arbitrária) de fluorescência sobre o local no qual foi realizada a competição entre *X. citri* $\Delta xac2611$ e *E.coli*. Nota-se que o sinal de imunodeteção de XAC2609 para a cepa de *X. citri* $\Delta xac2611$ é cerca de ~20 % maior do que o que foi observado para *X. citri* selvagem.

Como visto, em comparação com a cepa selvagem de *X. citri*, a cepa nocaute de $xac2611$ apresenta uma maior eficiência adaptativa e maiores níveis de secreção de XAC2609. Portanto, uma hipótese é a XAC2611 ser uma proteína associada a regular a expressão dos substratos ou a quantidade de T4SSs por célula de *X. citri*. Portanto, foram realizados ensaios de Western Blot com extratos totais de células de *X. citri* para monitorar os níveis de produção de XAC2609 e VirB7. Na Figura 23B, cepas de *X. citri* transformadas com o plasmídio pBRA-XAC2611 ($\Delta xac2611 + xac2611$ ($\Delta xac2611c$) e *X. citri* selvagem + $xac2611$ ($WT^{Xac2611}$)) e as cepas $\Delta xac2611$ e *X. citri* Selvagem (WT) contendo o vetor vazio de pBRA foram crescidas em meio 2x TY por 12 horas em condições induzidas e não induzidas com arabinose. Na Figura 23B, não são observadas diferenças nas quantidades de XAC2609 e de VirB7 em nenhuma das condições testadas. Logo, assumimos que as cepas utilizadas no ensaio (WT, $\Delta xac2611$, $\Delta xac2611c$ $WT^{Xac2611}$) não apresentam diferenças de expressão de XAC2609 e de VirB7 em condições induzidas e não induzidas de XAC2611. Este resultado sugere que XAC2611 não interfere na regulação da expressão ou produção dos substratos ou de componente do T4SS.

Também, outra possibilidade seria XAC2611 ter uma atividade tóxica contra a

célula produtora. Portanto, foram realizadas curvas de crescimento em meio 2x TY suplementado com arabinose utilizando as cepas de *X. citri* selvagem (WT), $\Delta xac2611$, $\Delta xac2611+xac2611$ ($\Delta xac2611c$) e *X. citri* selvagem + *xac2611* (WT^{*xac2611*}) ao longo de 24 horas de cultivo (Figura 23C). Não foram observadas evidências de toxicidade concomitante a superexpressão de XAC2611, pois nota-se que as taxas de crescimento para cepas WT^{*xac2611*} e $\Delta xac2611c$ foram similares ao observado nas cepas WT e $\Delta xac2611$. Também, na Figura 23D, não são observadas diferenças fenotípicas nas colônias isoladas de *X. citri* superexpressando XAC2611 crescidas em paralelo a experimentos de competição bacteriana entre *X. citri* e *E. coli*.

Figura 23. Ensaio funcionais envolvendo cepas nocautes de *xac2611*. A) Ensaio de secreção baseado na Imunodeteção de XAC2609 após competição entre cepas de *X. citri* e de *E. coli* sobre membrana de nitrocelulose. A Protocolo descrito no Anexo I e no tópico 3.4.4 desta Tese. B) Experimento de Western Blot de lisados celulares de *X. citri*. Culturas crescidas em meio 2x TY com e sem arabinose, após o crescimento as D.O._(600nm) foram normalizadas para 50 e as amostras foram submetidas ao tratamento padrão de Western Blot. As membranas foram tratadas com anticorpos anti-XAC2609 e anti-VirB7. C) Curvas de crescimento em meio 2x TY a 30 °C e meio contendo 0,3% de arabinose. D) Competição bacteriana entre *X. citri* e *E. coli* expressando β-galactosidase em meio contendo X-gal e IPTG. Na linha *X. citri* vs *E. coli* foram utilizadas misturas de 10:1 *X. citri* e *E. coli*. Na linha *X. citri* isolada, foram cultivadas as células isoladas em de *X. citri* paralelamente aos experimentos de competições. As cepas *X. citri* indicadas nos item A, B e C estão descritas na Figura para cada experimento. As cepas utilizadas foram: *X. citri* Selvagem GFP pBRAΦ (WT); *X. citri* Δ*xac2611* GFP pBRAΦ (Δ*xac2611*); *X. citri* Δ*xac2611* GFP + XAC2611 (Δ*xac2611c*); *X. citri* Selvagem GFP + XAC2611 (WT^{XAC2611}); *X. citri* Δ*virB7* GFP + VirB7 (Δ*virB7*).

4.2 Reconhecimento do substrato e secreção dos efetores via T4SS de *X. citri*

Com o objetivo de estudar as interações observadas nos ensaios de duplo híbrido entre VirD4 e o domínio XVPICD, inicialmente, foram realizadas diversas tentativas de purificação da proteína VirD4, todas sem sucesso. A construção utilizada VirD4_{HIS-83-557} clonada em vetor pET28a, corresponde porção citoplasmática de VirD4. Nota-se que essa proteína foi clonada ao longo do Projeto de Doutorado de Diorge Paulo de Souza em 2010. Naquela época, foi descrito a formação de cristais, que posteriormente confirmaram ser da chaperona Cpn60 proveniente da cepa de *E. coli ArcticExpress B121DE3 (Novagem)*. Apesar disso, novas tentativas de purificação de VirD4 foram realizadas, desta vez utilizando cepas diferentes de *E. coli*. Porém ainda são detectadas a presença de chaperonas ao longo de diferentes etapas de purificação de VirD4.

Apesar disso, a estrutura cristalográfica de TrwB indica a presença de dois domínios, o NBD que está associado a ligação e hidrólise do ATP e o domínio AAD. O domínio AAD é constituído por oito alfa hélices consecutivas e forma um poro citoplasmático exposto na entrada do canal do hexâmero de TrwB (Figura 3). Essa localização no contexto do hexâmero de TrwB, sugere que o AAD pode estar associado ao reconhecimento dos substratos dos T4SSs. Também, mutações em resíduos expostos no AAD aboliram a atividade de TrwB (de Paz et al. 2010). Adicionalmente, recentemente foi demonstrado que o domínio AAD das proteínas acopladoras VirD4 de *A. tumefaciens*, e de PcfC *E. faecalis* confere especificidade para ligação de proteínas relaxases (Whitaker et al. 2015).

Portanto, baseado nessas evidências estruturais e funcionais do domínio AAD ser a peça chave no reconhecimento dos substratos dos T4SSs, decidimos

investigar esta hipótese para estudar os aspectos da interação entre o domínio XVIPCD e a VirD4 de *X. citri*.

4.2.1 Determinação da região codificadora de VirD4_{AAD}

A análise da estrutura secundária de TrwB mostra que a única região na porção central de sua cadeia que apresenta oito α -hélices contínuas é aquela correspondente à região do AAD. Em VirD4 de *X. citri* as previsões de estrutura secundária indicam a presença de uma única região codificadora com cerca de dez α -hélices contínuas na porção central da proteína. Na Figura 24 estão os alinhamentos de sequência primária entre VirD4 de *X. citri*, VirD4 de *A. tumefaciens* e TrwB do plasmídeo R388 de *E. coli*. Nesse alinhamento estão indicadas as regiões formadoras de estruturas secundárias que entendemos ser o AAD de VirD4 de *X. citri*. Também estão representadas as regiões formadoras de α -hélices do domínio AAD de TrwB e do domínio VirD4_{AAD} de *A. tumefaciens* que foi identificado por previsões de estruturas secundárias com os software Phyre2. (Whitaker et al. 2015). Nota-se que os domínios AADs são flanqueados por folhas β -pregueadas nas extremidades N-terminais e C-terminais.

Adicionalmente, através de ensaios de duplo híbrido utilizando como isca a região de VirD4 de *X. citri* associada a codificar o domínio AAD, na época, a Pós Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo relatou identificar interações com presas de XVIPs. A partir destes fatos, foram construídos os pares de oligonucleotídeos para amplificar os aminoácidos 197-335 de VirD4, para expressão do fragmento que denominamos VirD4_{AAD}. Na porção N-terminal, foi escolhida uma região sem estrutura secundária prevista, flanqueada por uma folha β -pregueada. Na

extremidade C-terminal optou-se estender a sequência de VirD4_{AAD} até a décima α -hélice, próxima do início de uma região formadora de folha β pregueada (Figura 24).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

E.coli_TrwB      MHPDDQ-----RKVSA-----GIVIVLPLIFWITAVQKTEVL
X.citri_VirD4    ---MSKPKIIAIATLVAVLAGYCLSGYLTLLLRDLT-GLYGWDTYYRYFSAL-----
Atu_VirD4        MNSSKTTTPQRLAVSIVCSLAAGFCAASLYVTFRHGFNGEAMMTFSVFAFWYET-----
                  : *                               .:           : :

E.coli_TrwB      GSPKLLALWELMKLTTPQ----KPILLLSALGGLAVGVLFVWLLNSVGQGEFGGAPFKRFL
X.citri_VirD4    GLPQVAPYATKIKIAGVLGFGLPVLVW----A----IAVVLLIVKPKARALHGDARFAGA-
Atu_VirD4        --PLYMGHAT-----PVFYCGLAIVVSTSIWV-----LLSQLIISFRNHEHHGTARWAGF-
                  *                               ::           : . * * :

E.coli_TrwB      RGTRIVSGGKLRMTREKAKQV-----TVAGVPMPRDAEPRHLLVNGATGTGKS--VLL
X.citri_VirD4    --ADLSKHGLFKPSG--NGIVV-----GKFNGK-LVRLSGQQFVILAAPTRSGKGVGVVI
Atu_VirD4        --GEMRHAGYLQRYNRIKGIPIFGKTCGRPWFGS-YLTNGEQPHSLVAPTRAGKGVGVVI
                  : * ::           . . *           . : . * : : : * : :

E.coli_TrwB      RE-LAYTGLLRGDRMVIDVPNGDMLS-----KFGGRDKDIIILNPYD--QRTKGWSFFNEI
X.citri_VirD4    PNLLEYQE-----SVVVDLIKQENFDLTSGWRASQGHEVLFENPFPAEDRRTHRWNPITYV
Atu_VirD4        PTLTTFKG-----SVIALDVKGELFELTSRARKAGGDAVFKFSPLDPERRTHCYNPVLDI
                  * :           : : * : : . :           . : : * : : : :

E.coli_TrwB      RNDYDWQR-----YALSVVPRGKTDEAEWASYGRLLLRRETAKE-----LA
X.citri_VirD4    SNDPAFRV-SDLMSIAAMLYP-DGSDDDQKFWVSQARNAFMAFALYLFENWDEELSLGFPFG
Atu_VirD4        AALPPEQFTETRRLLAANLIT-AGKGGAEGFIDGARDLFVAGILT-----CI
                  : * :           . : : . * :           :

E.coli_TrwB      LIGTPSMRELFHWTTIATFDDLGRGFLEGTLAESLFASSNEASKALTSARFVLSDKLPEHV
X.citri_VirD4    GAGAPTLGGIYRLSSGD-GTDLKKYLK-SLSERRFLSSNAK-SAFANL-LSQADET---F
Atu_VirD4        ERGTPTIGAVYDLFAQF-GEKYKLFAP-LAESRN--KEAQ-RIFDNM-AGNDTKILTSY
                  * : : : : : * :           . : : . :           :

E.coli_TrwB      --TMPDGDIFSIRSWLEDPN-----GGNLFITWR---EDMGPALRPLI
X.citri_VirD4    ASIMGTTLKEPLNAWINPVLDAAATSADDFVLTDLRKKKMTIYIGIQPNKLAESRLIINLLF
Atu_VirD4        TSVLG--DGGLNLWADPLVKAATSRSDFSVYDLRRKRTCVYLCVSPNDLEVVAPLMRLLF
                  : . : . * :           : : :           : : * :

E.coli_TrwB      SAWVDVCTSIILSPEEPKRRLLWLFIDELASLEKLASLADALTGKRKAGLRVVAGLQSTS
X.citri_VirD4    SQIINLNTRELPKSNPELKYQCLLLMDEFTSIGKVDIIATAVAYMAGYNIRLLPIIQSMA
Atu_VirD4        QQVVSILQSRSLPGKDE--RHEVLFLLEDFKHLGKLEAIETAITTIAGYKGRFMFIQSLS
                  . : : . :           . : : : : * : : * : : * : : : :

E.coli_TrwB      QLDDVYGVKEAQTILRASFRSLVLGGSRTPDKTNEEDMSLSLGEHEVERDRYSKNTGKHHS
X.citri_VirD4    QLDATYGKDLRTIITNHALQILYAP--REQQDANDYSEMGLYTTIKKKNVTR---GRE
Atu_VirD4        ALTGIYDDAGKQNFSLNTGVQVFMA--ADDETPTYISKAGIDYTFKARSTSYSQARMFD
                  * * . : : : . :           . : : * : * : : :

E.coli_TrwB      TGRALERVRRVMPAEIANLPDLTAYVGFAGNRPIAKVPLEIKQFANRQPA-FVE---G
X.citri_VirD4    TTHSVSEERRALMLPQELKAMGNEKEVFLYEGIPHPVKC-DKIRYYEDRHFTARLLPKT-
Atu_VirD4        HNIQISDQGAPLLRPEQVRLDDNNEIVLIKGHF-PLKL-RKVRYYSRMLRRLFECQIG
                  : . : : * : : : . : * : : : : * :

E.coli_TrwB      TI-----
X.citri_VirD4    ---EVKTLTIRM-----
Atu_VirD4        ALPEPASLMLSEGVRHDGQDLSQQAAVTEAQGLGDIDSIPNNMEAATPQNSEMDDEQDSL

E.coli_TrwB      -----
X.citri_VirD4    -----
Atu_VirD4        PTGIDVPQGLIESDEVKEDAGGVVPDFGVSAEMAFAMIAQQQLLEQIIALQQRYGPASSH

```

Figura 24. Alinhamento de sequências de T4CPs. TrwB do plasmídeo R388 de *E. coli* (E.coli_TrwB), VirD4 de *X. citri* (X.citri_VirD4) e VirD4 de *A. tumefaciens* (Atu_VirD4) realizadas pelo programa Clustal Omega. As regiões realçadas em cinza correspondem regiões de hélices transmembranas. Em **negrito** corresponde a região formadora do domínio AAD. Realçadas em vermelho, estão as regiões associadas a formarem as estruturas secundárias de α -hélices presentes no domínio AAD de TrwB, em amarelo estão realçadas as regiões formadoras de alfa hélices do AAD de VirD4 de *X. citri* preditas pelo softwares I-TASSER (Zhang 2008) e Phyre2 (Kelley et al. 2015), em marrom estão as regiões de alfa hélices de

VirD4_{AAD} de *A. tumefaciens*, preditas pelo software Phyre2, tal como descrito no trabalho de (Whitaker et al. 2015). Realçado em azul, estão são indicadas a presença de folhas β pregueadas flanqueando os domínios AADs de *E. coli*_TrwB, *Atu*_VirD4 e *X.citri*_VirD4. Sublinhado corresponde a região clonada em vetor pET28 de VirD4_{AAD} de *X. citri*.

4.2.2 Purificação de VirD4_{AAD}, XAC2609XVIPCD e do complexo VirD4_{AAD}-XAC2609XVIPCD

Figura 25 apresenta uma análise das frações obtidas em cada uma das etapas de purificação de VirD4_{HIS-AAD}. A Figura 25A apresenta um gel de SDS-PAGE das frações de purificação por cromatografia de afinidade empregando uma coluna de níquel. Nota-se o aparecimento de uma banda, entre 25 KDa e 18.4 KDa, de proteínas na fração induzida (I) anteriormente ausente na fração não induzida (NI). Assume-se que essa banda corresponde produção de VirD4_{HIS-AAD} concomitante a adição de IPTG nas culturas de expressão. VirD4_{HIS-AAD} é solúvel como observado na fração do sobrenadante (S) da centrifugação do lisado de *E. coli* BL21(DE3) após a indução de expressão de VirD4_{HIS-AAD}. As frações de eluição (1, 2 e 3) por gradiente de imidazol (20-500mM) apresentam uma banda única, que assumimos ser VirD4_{HIS-AAD}. Na Figura 25B, é observado uma banda homogênea de VirD4_{HIS-AAD} presente em amostras eluídas na purificação de VirD4_{HIS-AAD} por cromatografia de Exclusão Molecular. A Figura 25C, corresponde ao espectro de massas (massa/carga (m/z)) de amostra proveniente da purificação por cromatografia de Exclusão Molecular. O sinal predominante observado no espectro de massas compreende uma faixa entre 19.850 m/z e 19.986 m/z. Estes resultados indicam que a expressão e purificação de VirD4_{HIS-AAD} ocorreram de acordo com o esperado, visto que a sequência primária corresponde a uma massa molecular de 19.896 Da. Porém, são observados picos com valores m/z cerca de 2x (39887 Da) e 3x (59785 Da) a massa esperada de VirD4_{HIS-AAD}, mostrando a presença de oligômeros desse

domínio no espectro de massas. Contudo, não é possível afirmar que a oligomerização de VirD4_{HIS-AAD} observada através do espectro de massas seja um fenômeno natural, pois o durante o processo de ionização no MALDI frequentemente ocorre a formação de dímeros e trímeros de proteínas, nota-se também que o tratamento das amostras são feitas com agentes desnaturantes para proteína.

Figura 25. Gel SDS-PAGE 16% correspondentes às etapas de purificação de VirD4_{AAD} e espectro de massas da VirD4_{HIS-AAD}. A) Gel Tricina SDS-PAGE 16 % da etapa de purificação por cromatografia de afinidade por cauda poli-histidina. Padrão de massa molecular (M), as massas associadas estão indicadas a esquerda do gel em KDa; (NI) fração não induzida, (I) fração induzida com IPTG 0,4 mM. (Sob) fração do sobrenadante de lise celular; (FT) frações eluídas nas etapas de lavagens; Frações 1, 2 e 3 correspondem à bandas de eluição de VirD4_{AAD}. B) Gel SDS-PAGE 16% da etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular em resina

Superdex 75. Frações 4, 5, 6, 7 correspondem às frações eluídas de VirD4_{AAD} ao longo desta etapa de purificação. C) Espectro de Massas massa/carga de amostra proveniente da purificação por Cromatografia de Exclusão Molecular de VirD4_{AAD}.

Para estudar aspectos estruturais e bioquímicos de VirD4_{AAD}, a cauda poli-histidina da VirD4_{HIS-AAD} era tipicamente removida por meio de digestão com a enzima trombina (Figura 26), especificamente as amostras subsequentemente empregadas em experimentos de SAXS e RMN (estas marcadas com ¹⁵N e ¹³C). Figura 26 apresenta um gel de SDS PAGE dos produtos de clivagem tipicamente observado. Após a clivagem da cauda de poli-histidina N-Terminal, o produto, que é denominado ao longo dessa tese como VirD4_{AAD}, apresenta massa teórica de 18014 Da. A análise do SDS-PAGE indica que a reação de clivagem da cauda de poli-histidina N-terminal atinge um padrão homogêneo após algumas horas de reação. VirD4_{HIS-AAD} e VirD4_{AAD} são construções estáveis quando entre pHs 7,2 a pH 8 na presença de pelo menos 2% glicerol.

Figura 26. Análise em gel de Tricina SDS-PAGE 16 % de clivagem da cauda de poli-histidina N-terminal por Trombina. (M) Marcador Molecular, (1) Tempo zero de

reação, (2) 1 hora de reação, (3) 2 horas de reação, (4) 3 horas de reação, (5) 4 horas de reação, (6) 12 horas de reação.

A Figura 27 correspondente a purificação do domínio XAC2609_{XVIPCD} por cromatografia de troca aniônica. Experimentos de espectrometria de massas anteriormente realizados pelo Doutor Diorge Paulo de Souza confirmaram uma massa experimental de 13374 Da para o produto de purificação correspondente de XAC2609_{XVIPCD}. A massa calculada pela estrutura primária de XAC2609_{XVIPCD} é de 13420 Da.

Figura 27. Tricina SDS-PAGE 16% relativo às etapas de purificação por troca aniônica em coluna Q-sepharose de XAC2609_{XVIPCD}. (M) marcador molecular e pesos moleculares correspondentes estão indicados na porção esquerda do gel em KDa; (NI) Fração não induzida; (I) Fração Induzida; (S) Sobrenadante; (FT) frações eluídas ao longo da etapa de inicial de lavagem da coluna; Frações da etapas eluição de XAC2609_{XVIPCD} por gradiente de NaCl (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8).

O ensaio de *Pull-Down* é uma técnica de purificação por cromatografia de afinidade utilizada para estudar a interação específica entre proteínas *in vitro*. (Smith and Johnson 1988). Para isso é utilizado uma proteína *Isca* que se ligue uma matriz fixa e uma proteína *Presa* que ira interagir com a *Isca* por meio de interação específica formando um complexo estável proteína-proteína (*Isca-Presa*) a partir de

um lisado bacteriano. Após a eluição por gradiente específico, é obtido frações purificadas complexo *Isca-Presa* em solução.

Para testar se os domínios VirD4_{HIS-AAD} e XAC2609_{XVIPCD} poderiam formar um complexo estável, as frações solúveis de lisados de culturas de *E. coli* expressando VirD4_{HIS-AAD} e XAC2609_{XVIPCD} (S) foram misturadas e aplicadas em uma coluna de *Sepharose-NTA* carregada com Ni²⁺. Após a lavagem das proteínas não ligadas, as proteínas ligadas foram eluidas com um gradiente de imidazol (20-500 mM). Figura 28A mostra que as proteínas retidas na coluna têm massas equivalentes às massas presentes nas frações induzidas de XAC2609_{XVIPCD} (I1) e VirD4_{HIS-AAD} (I2). Experimentos de Western Blot (Figura 28B) indicaram a presença de XAC2609_{XVIPCD} e VirD4_{HIS-AAD} nas frações de eluição no experimento de *Pull Down*. Essa foi a primeira evidência de que VirD4_{AAD} e XVIPCD poderiam formar um complexo estável *in vitro*.

Figura 28. Análise por SDS PAGE e Western Blot de etapa de co-purificação de VirD4_{HIS-AAD}-XAC2609_{XVIPCD}. A) Tricina SDS-PAGE 16% correspondente a etapa de co-purificação do complexo VirD4_{HIS-AAD}-XAC2609_{XVIPCD} por cromatografia de afinidade por cauda de poli-histidina N-Terminal. (NI) Fração não induzida, (I1) Fração induzida de XAC2609_{XVIPCD}; (I2) Fração induzida de VirD4_{HIS-AAD}. (S) mistura de sobrenadante dos lisados de VirD4_{HIS-AAD} e XAC2609_{XVIPCD}. (FT) Fração eluída ao longo da etapa de lavagem da coluna; (1, 2, 3) Frações eluidas ao longo do gradiente crescente de imidazol (20mM<-500mM) após a etapa de lavagem da coluna. B) Western Blot de frações purificadas do complexo VirD4_{HIS-AAD}-

XAC2609_{XVIPCD} por cromatografia de afinidade por cauda de poli-histidina. (4) Imunodeteção com anticorpo primário anti-XAC2609 (α -anti-Xac2609); (5) Imunodeteção com anticorpos primários anti-XAC2609 (α -anti-Xac2609) e anti-cauda de poli-histidina (α -anti-HisTag).

4.2.3 Ligação cruzada por glutaraldeído

Experimentos de ligação cruzada por glutaraldeído foram feitos para detectar interações proteína-proteína possivelmente existentes entre XAC2609_{XVIPCD}-XAC2609_{XVIPCD}, XAC2609_{XVIPCD}-VirD4_{HIS-AAD} e VirD4_{HIS-AAD}-VirD4_{HIS-AAD}. Figura 29 apresenta o gel de acrilamida SDS PAGE 16% dos produtos das reações de ligação cruzada por glutaraldeído. Nos poços controles, foram aplicadas amostras puras de XAC2609_{XVIPCD} (30 μ M), VirD4_{HIS-AAD} (15 μ M) e uma mistura de XAC2609_{XVIPCD}/VirD4_{HIS-AAD} (30 μ M/15 μ M) sem glutaraldeído. Nestes poços não foram observadas espécies de alto peso molecular nas condições de gel desnaturante. Porém, na presença de glutaraldeído, são observadas bandas de oligomerização de VirD4_{HIS-AAD} após 10 minutos e 20 minutos de reação, com um aumento da intensidade em função do tempo. Misturas dos domínios XAC2609_{XVIPCD} e VirD4_{HIS-AAD} contendo glutaraldeído produzem dímeros VirD4_{HIS-AAD}-VirD4_{HIS-AAD} e também a formação do heterodímero XAC2609_{XVIPCD}-VirD4_{HIS-AAD}. Nota-se que as intensidades das bandas que correspondem a formação do heterodímero XAC2609_{XVIPCD}-VirD4_{HIS-AAD} é de maior intensidade do que aquela que corresponde ao homodímero de VirD4_{HIS-AAD}. Uma possível explicação é que a formação do heterodímero pode ser favorecida devido ao dobro de concentração de XAC2609_{XVIPCD} presente nas condições de reação. Não foram observados bandas de oligomerização para XAC2609_{XVIPCD} sozinho. Este resultado indica que XAC2609_{XVIPCD} é monomérica em solução.

Figura 29. Ligação cruzada por glutaraldeído de XAC2609_{XVIPCD} e VirD4_{HIS-AAD} visualizados por gel acrilamida SDS-PAGE 16%. Foram aplicados 5 µg de proteínas nos poços indicados como Controle negativo, 10 minutos e 20 minutos. As concentrações de amostras utilizadas foram :XAC2609_{XVIPCD} (30 µM); XAC2609_{XVIPCD} (30 µM) + VirD4_{HIS-AAD} (15 µM); VirD4_{HIS-AAD} (15 µM). Nos poços indicados por 10 minutos e 20 minutos as amostras foram incubadas com glutaraldeído 0,02% até o término da reação.

4.2.4 Experimentos de Dicroísmo Circular

No trabalho de Tese de Doutorado (Souza, 2010), por experimentos de dicroísmo circular, XAC2609_{XVIPCD} foi descrito como um domínio desenovelado que apresentava um aumento do conteúdo de estrutura secundária com o aumento da força iônica e pH. Com o objetivo de se aprofundar na caracterização XAC2609_{XVIPCD}, foram realizados experimentos de dicroísmo circular de XAC2609_{XVIPCD} em diferentes temperaturas (20 °C - 90 °C) em condição de tampão de pH 7 e baixa concentração salina (5 mM NaCl). Neste ensaio, (Figura 30) foi observado que a região de mínima elipsidade residual em todas as temperaturas estavam próximas de 200 nm. Nota-se também que as elipsidades residuais ao

longo do espectro de UV-distante (190-260) não sofreram mudanças significativas com o aumento da temperatura. Essas observações sugerem que não houve variação de estrutura secundária significativa nesta faixa de temperatura (20 °C - 90 °C). Portanto, constata-se que o espectro de dicroísmo circular de XAC2609_{XVIPCD} é característico ao observado em proteínas desenoveladas.

Figura 30. Ensaio de desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular. $\{\theta\}$ Elipsidade molar residual $\times 10^{-4}$ em função do comprimento de onda (nm). Amostras de XAC2609_{XVIPCD} foram monitoradas entre 190 nm e 260 nm nas temperaturas de 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C e 90 °C. Tampão: 1 mM Tris-HCl, pH 7, 5 mM NaCl

Uma característica de sequência primária no domínio XVIPCD é a presença de uma região rica em glutaminas na porção extremo C-terminal (Alegria et al. 2005). Com o objetivo de investigar se essa região rica em glutaminas pode influenciar no enovelamento do XVIPCD, foram realizados experimentos de

dicroísmo circular com o domínio mutante $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}^{\text{Q(397-431)A}}$. Nessa construção todas as glutaminas presentes entre os resíduos 397 e 431 de XAC2609 foram substituídos por alaninas. Na Figura 31 estão os espectros de dicroísmo circular de $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}$ e $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}^{\text{Q(397-431)A}}$. Comparando os espectros de CDs, plotados em termos da elipsidade molar residual em função do comprimento de onda (nm) infere-se que $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}^{\text{Q(397-431)A}}$ apresente uma maior quantidade de estrutura secundária em comparação com que $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}$. Nota-se um incremento da intensidade do sinal nas regiões de 220 nm e 208 nm, isso sugere uma maior presença de α -hélices na amostra $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}^{\text{Q(397-431)A}}$.

Figura 31. Espectro de Dicroísmo Circular. $[\theta]$ Elipsidade molar residual $\times 10^{-4}$ em função do comprimento de onda (nm). Amostras de $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}$ e $\text{XAC2609}_{\text{HIS-XVIPCD}}^{\text{Q(397-431)A}}$. Tampão : 5 mM Tris-HCl, pH8, 5 mM NaCl, 100 μM EDTA

4.2.5. Caracterização por Cromatografia Analítica de Exclusão Molecular (SEC)

Na Figura 32 está ilustrado o perfil de cromatográfico por exclusão molecular de XAC2609_{XVIPCD}, VirD4_{HIS-AAD} e complexo VirD4_{HIS-AAD}-XAC2609_{XVIPCD}. VirD4_{AAD} apresenta massa molecular de 19.8 KDa e elui com uma massa molecular aparente de 22,4 KDa. Conclui-se que VirD4_{HIS-AAD} comporta-se como um monômero em solução. XAC2609_{XVIPCD} apresenta massa molecular de 13.2 KDa. Porém elui com um peso molecular aparente de 34 KDa, isto corresponde a cerca de 2,6 vezes a massa molecular de sua sequência. Como observado nos experimentos de ligação cruzada por glutaraldeído (Figura 29) e de desnaturação térmica monitorado por dicroísmo circular (Figura 30), XAC2609_{XVIPCD} é monomérica e apresenta-se como um domínio desenovelado em solução. A partir disto, podemos hipotetizar que o perfil de eluição de XAC2609_{XVIPCD} condiz com o que é tipicamente observado para proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs). IDPs eluem com uma maior massa molecular aparente do que proteínas enoveladas de mesmo peso molecular (Uversky 2012). Interessantemente, a massa molecular aparente do complexo VirD4_{HIS-AAD}-XAC2609_{XVIPCD} está de acordo com esperado para proteínas globulares, pois o complexo copurificado VirD4_{HIS-AAD}-XAC2609_{XVIPCD} apresenta massa aparente de 32 KDa que é muito próxima à massa teórica do heterodímero de 33KDa (19.8 KDa + 13.2 KDa). Portanto, a análise dos padrões de eluição de SEC indicam que XAC2609_{XVIPCD}, concomitante a interação com VirD4_{HIS-AAD}, se enovela em solução.

Figura 32. Cromatografia de Filtração em Gel Analítica. Padrões de eluição de VirD4_{HIS-AAD} (vermelho), XAC2609_{XVIPCD} (preto) e a co-purificação de VirD4_{HIS-AAD}-XAC2609_{XVIPCD} (azul). Massa molecular aparente indicada acima do perfil de eluição. Tampão: 20 mM Tris-HCl, pH7, 100 mM NaCl.

4.2.6. Espalhamento de Raio-X à baixos Ângulos (SAXS)

Experimentos de Espalhamento de Raio-X à baixos Ângulos (SAXS) foram realizados para XAC2609_{XVIPCD}, VirD4_{AAD} e o complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD}. Em SAXS as amostras em solução são submetidas a um feixe de Raio-X e são coletados os espalhamentos elásticos de natureza construtiva a baixos ângulos. A partir disso, a curva de intensidade em função do vetor de espalhamento q ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$, sendo θ é o ângulo de espalhamento e λ é o comprimento de onda do feixe ($\text{\AA}$)) é utilizada para estimar diferentes aspectos estruturais das amostras. A resolução no espaço real (d) observada em um típico experimento de SAXS ao

longo da curva de espalhamento em função de q é estimada por $d=2\pi/q$.

Em SAXS, pode ser calculado o raio de giro (R_g) da macromolécula, que é uma medida da distribuição dos átomos em relação ao centro de massa da macromolécula espalhadora (polímeros enovelados e mais compactos tem raios de giro menores de polímeros desenovelados ou estendidos). A análise dos dados mostra que XAC2609_{XVIPCD} possui maior raio de giro (R_g de ~ 29 Å; Tabela 13 e Figura 33B) do que VirD4_{AAD} (~ 22 Å) e o complexo formado entre elas (~ 26 Å). O mesmo é observado para as dimensões máximas das macromoléculas (D_{max} ; Tabela 13 e Figura 33D). Estes resultados são consistentes com os que foram observados nos experimentos de filtração em gel analítica descritos acima (Figura 32).

Curvas de SAXS de proteínas enoveladas e desenoveladas apresentam diferentes proporcionalidades de decaimento de intensidade em função do vetor q . Especificamente, as intensidades das curvas de SAXS de proteínas enoveladas decaem de modo proporcional à quarta potência ($I(q) \sim q^{-4}$) enquanto as curvas de SAXS de proteínas desenoveladas decaem mais lentamente, de modo proporcional à segunda potência ($I(q) \sim q^{-2}$) (Putnam et al. 2007). Portanto, uma maneira prática de diferenciar estes dois grupos de proteínas é através do uso do gráfico de Kratky, que consiste em multiplicar os valores de intensidades $I(q)$ pelo vetor de espalhamento (q) elevado a segunda potência, logo definido por $I(q) \times q^2$ em função de q . No gráfico de Kratky, para altos valores de q , proteínas enoveladas apresentam um decaimento característico de sino, enquanto proteínas desenoveladas tentem a formar um platô. Na Figura 33C, o gráfico de Kratky indica fortemente que XAC2609_{XVIPCD} é desenovelada, visto a presença de um platô de intensidade para altos valores de q ($1/\text{Å}$) (Putnam et al. 2007). Este resultado

corroborar com o que foi observado no experimento de desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular (Figura 30). Portanto, a aparente maior dimensão de XAC2609_{XVIPCD} observadas por Filtração em gel (Figura 32) e pela análise de distribuição de distância $P(r)$ (Figura 33D) e Raio de Giro (33B) decorrem do fato de ser desenovelada. A compactação aparente de tamanho observada por Filtração em gel e de SAXS (Figura 33B-D) quando da formação do complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} deve decorrer do enovelamento do XVIPCD ocasionado pela interação. Adicionalmente, a massa molecular de VirD4_{AAD} e VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} tomando como referencial a intensidade de $I(0)$ de Lisozima foi estimada (Tabela 13). Os valores obtidos indicam que, VirD4_{AAD} e VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} correspondam respectivamente um monômero e um heterodímero em solução, respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros obtidos a partir dos dados de SAXS

Proteína	Massa estimada (kDa)	Massa real (kDa)	Rg (GNOM) (Å)	Rg (Guinier) (Å)	Volume de Porod (Å ³)	Densidade (g/L)	D.Max (Å)
VirD4 _{AAD}	23 ± 2	18.0	21.8	21.5	31865	0.9	65
XAC2609 _{XVIPCD}	N/A	13.4	29	29.8	N/A	N/A	95
VirD4 _{AAD} -XAC2609 _{XVIPCD}	32 ± 1	31.4	25.7	26.7	43498	1.19	85
Lisozima	Referência	14.3	14.3	14.5	19278	1.23	50

N/A: Não se aplica. Estimativas de massa, do volume de Porod e de densidade a partir de dados de SAXS foram caracterizadas particularmente para proteínas globulares (Mylonas & Svergun, 2007). D.Max- distância máxima da proteína.

Figura 33. Experimentos de SAXS. **A)** Curvas experimentais de espalhamento de raios-X a baixo ângulo de XAC2609_{XVIPCD} (verde), VirD4_{AAD} (vermelho) e do complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} (azul). **B)** O raio de giro de Guinier é extraído utilizando a fórmula $\ln(I) = \ln(I_0) - (Rg^2 \cdot q^2/3)$. Rg é proporcional a inclinação da reta. **C)** Gráfico de Kratky de XAC2609_{XVIPCD} (verde), VirD4_{AAD} (vermelho) e o complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} (azul). Notar que o domínio XAC2609_{XVIPCD} é desenovelado, segundo essa análise (platô com valor alto em $q^2 \cdot I$ na região de q acima de 0,1). **D)** Funções de distribuição de distâncias $P(r)$ de XAC2609_{XVIPCD} (verde), VirD4_{AAD} (vermelho) e o complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} (azul). Notar que a dimensão máxima (D_{max} , intercepto no eixo das abscissas) de XAC2609_{XVIPCD} é maior do que aquela observada para o seu complexo com VirD4_{AAD}.

4.2.7. Monitoração da interação VirD4_{AAD} e XAC2609_{XVIPCD} por RMN

Titulações envolvendo VirD4_{AAD} e XAC2609_{XVIPCD} foram realizadas e monitoradas por RMN. Os Espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -XAC2609_{XVIPCD} foram coletados com concentrações crescentes de ^{14}N -VirD4_{AAD} (Figura 34). Alguns picos surgem em troca lenta na escala de tempo de RMN, o que representa uma interação de alta afinidade. Particularmente, algumas correlações em troca lenta na interação provavelmente representam cadeias laterais de glutaminas, o que pode indicar que o trecho no extremo C-terminal dos XVIPCDs rico nesses resíduos possa estar envolvido na interação com a VirD4_{AAD}.

Figura 34. Estudos de RMN da interação AAD-XVIPCD. ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -XAC2609_{XVIPCD} na ausência (laranja) e na presença de concentrações crescentes de ^{14}N -VirD4_{AAD} (outras cores; último ponto da titulação em preto). Alguns picos de ^{15}N -XAC2609_{XVIPCD} surgem após a adição do domínio não marcado. Pares de correlações conectadas por linhas pontilhadas horizontais que surgiram após a

interação provavelmente correspondem à cadeias laterais de asparaginas ou glutaminas específicas. Os espectros de RMN 1D ^1H (abaixo, a direita) e 2D ^1H - ^{15}N (acima, a direita) durante a titulação são mostrados ampliados para um desses picos. A seta preta vertical indica o aparecimento do pico específico devido ao aumento da concentração de ^{14}N -VirD4_{AAD}.

Espectros de ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -VirD4_{AAD} foram coletados com concentrações crescentes de ^{14}N -XAC2609_{XVIPCD} (Figura 35). Diversos picos surgiram em troca lenta com a adição da proteína não marcada, porém outros desapareceram com a interação. Desaparecimento de picos indica aumento do tempo de correlação rotacional efetivo (τ_c) que tipicamente decorre da formação de um complexo de alto peso molecular e tombamento lento.

Mudanças em correlações ocorrem quando há mudança de ambiente químico do(s) núcleo(s) envolvido(s). Em um processo de interação entre moléculas, possivelmente aqueles resíduos cujas correlações sofrem alterações de frequência fazem parte da superfície envolvida com o reconhecimento molecular. Portanto, assume-se que o assinalamento das frequências de ressonância da cadeia principal de ^{15}N - ^{13}C -VirD4_{AAD} e ^{15}N - ^{13}C -XAC2609_{XVIPCD} poderá permitir a identificação de que regiões específicas de cada proteína estão envolvidas na interação entre elas.

Figura 35. Estudos da interação AAD-XVIPCD utilizando RMN. ^1H - ^{15}N HSQC de $^{15}\text{N-VirD4}_{\text{AAD}}$ na ausência (laranja) e na presença de concentrações crescente de $^{14}\text{N-XAC2609}_{\text{XVIPCD}}$ (outras cores; último ponto da titulação em preto). São mostradas regiões específicas ampliadas dos espectros de RMN 1D ^1H (abaixo, a direita) e 2D ^1H - ^{15}N (acima, a direita) contendo picos de $^{15}\text{N-VirD4}_{\text{AAD}}$ que sofrem influência da adição de $^{14}\text{N-XAC2609}_{\text{XVIPCD}}$. As setas pretas indicam os efeitos (surgimento, desaparecimento ou nenhum efeito) sobre picos particulares de $^{15}\text{N-VirD4}_{\text{AAD}}$.

4.2.8 Assinalamento parcial da cadeia principal de $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$

Também foi realizado o assinalamento parcial da cadeia principal do domínio $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$ ($\text{VirD4}_{197-356}$) pela técnica de RMN. Até o presente momento, foram assinalados 104 resíduos de um total de 156 resíduos assinaláveis da cadeia principal de $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$. A partir dos valores de deslocamento químico $^1\text{H}\alpha^1$, $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, ^{13}CO e $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ (Tabela 14), as restrições dos ângulos diedrais ψ e ϕ dos resíduos assinalados foram utilizadas para a predição da estrutura secundária do domínio $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$ (Figura 36). Nota-se que $\text{VirD4}_{\text{AAD}}$ apresenta pelo menos 6 alfa hélices ao longo da cadeia polipeptídica. Futuramente, poderão ser realizados novos

experimentos de coletas de dados de RMN com o objetivo de completar o assinalamento da cadeia principal de VirD4_{AAD} para determinar a interface de interação entre VirD4_{AAD} e Xac2609_{XVIPCD}.

Tabela 14. Deslocamentos químicos assinalados da cadeia principal de VirD4_{AAD} x100 de ¹Hα¹ (H), ¹³Ca (Ca), ¹³C_β (Cb), ¹³CO (C) e ¹⁵N^H (N).

Posição/Resíduo	H	N	C	Ca	Cb	Posição/Resíduo	H	N	C	Ca	Cb
205Val	685	12027	17580	6227	3291	288Leu	891	11963	17879	5761	4249
206Ser	934	12281	None	5955	6436	289Lys	832	11996	17983	5913	3180
207Asn	834	12069	17535	5345	3859	290Ser	773	11585	None	6182	6273
208Asp	866	12417	17557	5161	4289	291Leu	746	12246	17812	5800	4052
210Ala	834	11925	17991	5447	1843	292Ser	727	11042	17350	6054	6353
211Phe	791	11742	17646	5886	3917	293Glu	None	11904	17710	5568	3000
218Ser	791	11692	17656	6224	None	294Arg	721	12026	17914	5648	2971
219Ile	767	12313	17780	6534	None	296Phe	647	11213	17508	5585	3818
220Ala	882	12263	17859	5512	1787	297Leu	642	12213	17797	5479	4385
221Ala	769	11752	17838	5418	None	298Ser	1084	12247	17628	5797	None
226Asp	829	11825	17681	5587	4161	301Ala	820	12464	17967	5596	2012
227Gly	846	11019	17421	4505	None	302Lys	880	11742	18010	6127	3244
228Ser	858	11915	None	5823	6456	303Ser	848	11568	17609	6172	6271
229Asp	792	13148	18234	5396	None	304Ala	759	12514	18182	5522	1725
239Arg	804	11872	17688	5697	3033	305Phe	850	11728	17778	6381	3961
240Asn	786	11999	17665	None	3299	306Ala	852	12138	18062	5563	1785
241Ala	800	12145	17716	5486	1834	307Asn	794	11619	17742	5585	3876
242Phe	853	11804	17616	6303	3885	308Leu	737	12153	17766	5806	4248
243Met	801	11677	17787	5669	2943	309Leu	867	11490	17735	5691	4157
244Ala	773	12083	None	5578	1537	310Ser	759	11206	17495	5913	None
245Phe	762	11321	17749	5970	3966	311Gln	746	12010	17530	5469	2813
246Ala	927	12082	18005	5580	1920	312Ala	872	12427	17848	5231	1959
247Leu	893	11718	17862	5893	4094	314Glu	961	11882	None	5986	2893
248Tyr	None	11826	17741	6314	3826	315Thr	756	11610	17601	6568	None
249Leu	833	11720	18143	5816	4245	316Phe	883	12234	17659	6251	None
250Phe	902	11970	17731	6438	3896	317Ala	852	12038	18127	5562	1792
251Glu	933	12026	18011	5970	2834	318Ser	789	11597	17754	6211	None
253Trp	782	12255	17716	5950	2859	319Ile	866	12548	None	6646	3813
254Asp	859	11802	17948	5738	4041	320Met	814	11699	17925	5670	3101
255Glu	736	12059	17861	5930	2884	321Gly	810	10622	17656	4751	None
256Glu	831	12109	17998	6000	2953	322Thr	793	11986	None	6687	None
257Leu	854	11994	18045	5758	4159	323Leu	845	12147	17963	5789	None
258Ser	779	11578	17586	6098	6306	324Lys	793	11465	17828	6019	3357
259Leu	771	12048	17824	5556	None	325Glu	747	11814	17647	None	2701
260Gly	768	10660	17437	4613	None	327Leu	807	12203	None	None	None
261Phe	790	11981	None	5567	None	328Asn	777	11752	17661	5677	3922
266Gly	847	10736	17242	4444	None	329Ala	778	11879	17784	5385	1843
267Ala	753	12327	17562	5012	None	330Trp	776	11626	17631	5872	3003
272Gly	819	11182	17685	4691	None	335Leu	793	11900	17621	6275	3235
273Ile	741	12312	17723	6558	None	336Asp	None	12436	17702	4253	3237
274Tyr	806	12118	17885	6206	3862	337Ala	816	12064	17587	5445	4151
275Arg	861	12003	17955	5994	3020	338Ala	801	12377	17747	5277	1935
276Leu	797	12165	17839	5817	None	339Thr	817	12231	17629	None	None
277Ser	755	11036	17377	6035	None	340Ser	798	11226	17455	6183	7002
278Ser	717	11462	17503	6395	None	341Ala	823	11771	17311	None	6392
279Gly	725	10715	17243	4510	None	342Asp	830	12581	17757	5298	1929
280Asp	771	11939	17718	5283	4167	343Asp	809	11863	17617	5482	4123
281Gly	854	10948	17507	4534	None	344Phe	None	None	17519	5786	3959
282Thr	792	11342	17443	6204	None	345Val	784	12212	None	None	None
287Tyr	828	12266	17818	6095	3855	346Leu	820	12663	17642	5526	None
						347Thr	765	12043	17902	6315	None

Figura 37. Modelo estrutural de VirD4_{AAD}. Foram sobrepostos o modelo de fitas com o software ITASSER e o envelope obtido por SAXS (rede cinza) de VirD4_{AAD}. Realçado no modelo de Fitas (amarelo) estão notadas as regiões assinaladas (roxo) da cadeia principal de VirD4_{AAD}. Os modelos estruturais de envelope e de Fitas foram visualizados com o uso do software CHIMERA (Pettersen et al. 2004). O N-terminal (azul) e C-terminal (vermelho) estão indicados como NT e CT, respectivamente.

4.2.9 Titulação por calorimetria isotérmica (ITC) e ensaios de secreção de XAC2609.

A hipótese inicial de que o XVIPCD é um sinal de secreção dos substratos do T4SS de *X.citri* foi baseada nas interações observadas nos experimentos de duplo híbrido entre VirD4 e as proteínas XVIPS (Alegria et al. 2005). Porém, a evidência do fenômeno de secreção que conecta o T4SS, as proteínas XVIPS, o domínio XVIPCD e uma célula-alvo está na Figura 38 e no Anexo I desta Tese (Souza et al. 2015). Neste ensaio, inicialmente são realizados co-cultivos de cepas *X. citri* e *E. coli* sobre membrana de nitrocelulose sobre meio LB agar. Após 12 horas de competição, as membranas são lavadas com água corrente para retirada das células e tratadas com anticorpos anti-XAC2609. Ao fim do processo de incubação com anticorpos, são detectados sinais de XAC2609 somente nas cepas de *X.citri* selvagens e em cepas que produzem um T4SS funcional e XAC2609 contendo o seu domínio XVIPCD íntegro. Nota-se também que o sinal de XAC2609 depende de presença de *E. coli*

para ser imunodetectada. Logo, esse resultado mostra que a secreção de XAC2609 por *X. citri* é dependente de: i) um T4SS funcional, ii) um domínio XVIPCD, iii) um contato com uma célula-alvo.

Figura 38. A secreção de XAC2609 requer um XVIPCD, um T4SS funcional e é estimulada por co-cultura com células de *E. coli*. Células *X.citri* (linha superior) cultivadas de maneira isolada e *X. citri* co-cultivadas com *E. coli* (*X. citri* vs *E. coli*). Sinal de imunodeteção de XAC2609 é indicado por manchas pretas. A cepa de *X.citri* selvagem (WT) e os mutantes derivados ($\Delta virD4$, $\Delta virB7$ e $\Delta xac2609$) e estirpes complementadas ($\Delta virD4 + virD4$, $\Delta virB7 + virB7$, $\Delta xac2609 + xac2609$ e $\Delta xac2609 + xac2609Nt$) estão indicados na parte superior da Figura. Figura modificada de (Souza et al. 2015).

Com o objetivo de investigar regiões importantes no domínio XVIPCD que estão associadas na interação com VirD4, foram realizados mutações sítio-dirigidas em regiões conservadas ao longo da sequência de XAC2609_{XVIPCD}. Géis de SDS-PAGE destes polipeptídeos purificados por cromatografia de afinidade estão apresentados na Figura 39. Os mutantes de XAC2609_{HIS-XVIPCD} utilizados neste ensaio tiveram sua massa confirmada por espectrometria de massa (dados não mostrados).

Figura 39. Gel Tricina SDS-PAGE 16% de amostras purificadas de construções derivadas de XAC2609 e XAC2609_{XVIPCD}.

Na Figura 40A, está o Logotipo de Sequência (*Web Logo*) (Crooks et al. 2004) baseado no alinhamento 1555 sequências de XVIPCDs distribuídos em 110 de espécies de bactérias da família de Xanthomonadaceae, incluindo 10 espécies de *Lisobacter* (244 XVIPCDs), 81 espécies de *Xanthomonas* (1013 XVIPCDs), 17 espécies de *Stenotrophomonas* (284 XVIPCDs), 10 espécies de *Pseudoxanthomonas* (6 XVIPCDs) e *Pseudomonas geniculata* N1 (8 XVIPCDs). A comparação do *Web Logo* com a sequência primária de XAC2609_{XVIPCD} (Figura 40A) mostra que o domínio XAC2609_{XVIPCD} codifica resíduos que são notavelmente conservados na família dos XVIPCDs. Isto indica que o domínio XVIPCD de XAC2609 pode ser utilizado como um modelo representativo dos XVIPCDs.

Titulação por calorimetria exotérmica (ITC) é utilizada para estudar interações proteína-ligante e proteína-proteína. Neste experimento, o calor liberado ou absorvido (q_i) a cada injeção de um ligante é proporcional ao aumento na concentração do complexo na cela do calorímetro. A partir disso, conhecendo as concentrações dos ligantes na cela e na seringa, análises de regressões não

lineares de q_i permitem estimar as constantes termodinâmicas de dissociação (K_d), entalpia molar (ΔH) e entropia (ΔS) de ligação (Velazquez-Campoy et al. 2004).

Isotermos de ITC representativos para as titulações entre mutantes derivados de XAC2609_{HIS-XVIPCD} contra VirD4_{HIS-AAD} estão apresentados na Figura 40B. Os valores de ΔH de ligação e K_d estão listados na Tabela 15. Constata-se que o regime de interação entre VirD4_{AAD} e XVIPCD é exotérmico, visto que o ΔH foi negativo para as construções selvagens de XAC2609_{XVIPCD} (XAC2609_{HIS-XVIPCD}) e XAC2609 (XAC2609_{HIS}). Nota-se nessas titulações que a presença do domínio N-terminal de XAC2609 não altera a afinidade de ligação por VirD4_{HIS-AAD} (Tabela 15), pois não são observadas diferenças significativas entre os valores K_d s. É sabido a existência de uma grande diversidade de arquiteturas nas porções N-terminais de diferentes XVIPs (Alegria et al. 2005; Souza et al. 2015), portanto era esperado que a porção N-Terminal de uma XVIP não influenciasse no fenômeno de ligação entre o seu domínio XVIPCD e VirD4. Titulações envolvendo as construções sintéticas XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} e XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)S}, nas quais as glutaminas presentes entre os aminoácidos 397-431 do XVIPCD de XAC2609 foram substituídas por alaninas (XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A}) e serinas (XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)S}), indicaram que estes mutantes apresentam um valor de K_d levemente menor em comparação com os as titulações controles de XAC2609_{HIS-XVIPCD} e XAC2609_{HIS} (Tabela 15). Esse resultado é surpreendente visto que a região rica em glutaminas presente no extremo C-Terminal é conservada dentre todos os XVIPCDs preditos pelo nosso grupo (Alegria et al. 2005; Souza et al. 2015). Uma outra característica observada é que a quantidade de calor liberado por mol de ligação (ΔH) para os mutantes XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} e XAC 2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)S} foi menor do que o observado em relação as titulações controles (Tabela 15).

Com o objetivo de verificar se a interação entre o domínio XVIPCD com VirD4 está acoplada ao fenômeno de secreção dos substratos de modo dependente do T4SS, foram construídas cepas de *X. citri* com o gene de *xac2609* deletado e complementadas com XAC2609 apresentando as mutações tais como utilizadas nos experimentos de ITC (Figura 41).

Nos experimentos de ITC, foi observado que o Kd obtido a partir da titulação do mutante triplo XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{H315A_P316A_D317A} é cerca de 4 vezes maior em relação a construção selvagem XAC2609_{HIS-XVIPCD} (Tabela 15). Apesar de continuar interagindo com VirD4_{HIS-AAD}, os ensaios de secreção com a cepa de *X. citri* $\Delta xac2609$ + XAC2609^{H315A_P316A_D317A} indicam que o trecho 315HPD317 é importante para secreção do substrato, visto que não foi observado o sinal de imunodeteção de XAC2609^{H315A_P316A_D317A} no ensaio de secreção (Figura 41). Resultados semelhantes foram observados em experimentos de ITC e secreção envolvendo, respectivamente, a construção XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{P400A} e a cepa *X. citri* $\Delta xac2609$ + XAC2609^{P400A} (Tabela 15, Figura 41). A mutação da P400A promoveu um aumento do Kd em comparação com as titulações controles e não foi observada secreção de XAC2609^{P400A} (Tabela 15, Figura 41). Os controles positivos dos experimentos de secreção (Figura 41) indicam que *X. citri* é capaz de produzir os mutantes XAC2609^{P400A} e XAC2609^{H315A_P316A_D317A}. Estes experimentos indicam que uma forte interação entre VirD4_{AAD} e XVIPCD é necessária para secreção de uma XVIPCD via o T4SS.

Nota-se no perfil de conservação de sequência do XVIPCD (Figura 40A) que o asparto 363 é altamente conservado. O experimento de ITC realizado com o mutante pontual D363A apresentou um grande aumento no valor de Kd em relação às titulações selvagens (Tabela 15). Nota-se que XAC2609^{D363A} é produzida em

pouca quantidade em *X. citri* como evidenciado por ensaios de Western Blot e de secreção (Figura 41), portanto não foi possível acessar informação correlacionada a secreção para este mutante. Adicionalmente, não foram detectados sinais de interação por ITC no experimento realizado com o duplo mutante XAC2609_{HIS}-XVIPCD^{F375A_V377A} (Figura 40B). Também, *X. citri* não é capaz de expressar corretamente o mutante XAC2609^{F375A_V377A} como evidenciado nos experimentos de western Blot e no controle positivo de lise bacteriana (Figura 41).

Experimentos de interação por ITC e de secreção dependente do T4SS também foram feitos empregando os mutantes XAC2609_{HIS}-XVIPCD^{D383A-P384A} e XAC2609^{D383A_P384A}. A análise do isoterma de ITC para a titulação indica que essa dupla mutação alterou drasticamente o regime de interação com entre VirD4_{AAD} e o XVIPCD (Figura 40B). Logo não foi possível estimar um valor de Kd e de ΔH de ligação entre XAC2609_{HIS}-XVIPCD^{D383A-P384A} e VirD4_{AAD}. Portanto podemos afirmar que a região do D383 e P384 é importante para a ligação do XVIPCD com VirD4. Na Figura 41 observa-se que a cepa *X. citri* $\Delta xac2609$ + XAC2609^{D383A-P384A} não é capaz de secretar XAC2609^{D383A_P384A}. Os controles feitos por Western Blot indicam que *X. citri* produz XAC2609^{D383A_P384A} normalmente. A partir disso, é possível inferir que a secreção de uma XVIP é dependente da interação de seu XVIPCD com VirD4.

Nota-se que as substituições na G336W, A396M e a inserção de um códon de terminação na posição 426 (resultando na deleção dos últimos seis aminoácidos) não alteraram significativamente os valores de Kd em comparação com a construção selvagem XAC2609_{HIS}-XVIPCD (Figura 40B, Tabela 15). Adicionalmente, observou-se que o fenômeno de secreção não foi alterado nas cepas de *X. citri* $\Delta xac2609$ complementadas com XAC2609^{G336W}, XAC2609^{A396M} e XAC2609^{S426Ter} (Figura 41).

Figura 40. Titulação por calorimetria isotérmica entre VirD4_{AAD} e diferentes mutantes

do XVIPCD de XAC2609. A) Logotipo de sequência determinado a partir do alinhamento múltiplo de 1555 XVIPCDs. A altura do empilhamento indica a conservação da sequência em cada posição, enquanto a altura do símbolo dentro do empilhamento indica a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição. Abaixo do logotipo de sequência, está a sequência primária de XAC2609_{XVIPCD}. Abaixo da sequência primária de XAC2609_{XVIPCD} estão indicadas as mutações sítio dirigidas realizadas ao longo da sequência de XAC2609_{XVIPCD}. O trecho da sequência primária de XAC2609_{XVIPCD} sublinhado em verde corresponde a região 397-431, cuja as glutaminas foram substituídas por alaninas ou serinas nos vetores pET28a sintéticos XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} e XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)S}. B) Curvas de calor das titulações realizadas entre VirD4_{HIS-AAD} e diversos mutantes do XVIPCD de XAC2609. Os mutantes de XAC2609_{XVIPCD} utilizados em cada titulação estão descritos pelo tipo de mutação acima de cada experimento. Em verde estão notados os resíduos e titulações que não apresentaram uma diminuição da afinidade de ligação em comparação com a construção controle XAC2609_{HIS-XVIPCD}. Em vermelho estão indicados os resíduos e mutações que promoveram uma diminuição da afinidade de ligação em comparação com a construção controle XAC2609_{HIS-XVIPCD}.

Tabela 15. Resumo dos resultados dos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica. As mutações realizadas estão sobrescritas e numeradas de acordo com a sequência primária de XAC2609. A substituição do códon da serina 426 por um códon de terminação corresponde a construção XAC2609^{HIS-XVIPCD}^{S426Ter}. Nas construções XAC2609^{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} e XAC2609^{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)S} resíduos codificantes de glutamina entre os códon 392 e 431 de XAC2609 foram substituídos por respectivamente, alaninas e serinas. Em vermelho estão destacadas as construções que afetaram K_d e ΔH em comparação com o domínio selvagem. ND indica valores indeterminados de K_d ou ΔH . Todas as construções utilizadas estavam clonadas em vetor de expressão pET28a e apresentam calda de Histidina N-terminal. Tipicamente, VirD4^{HIS-AAD} era adicionado na cela de titulação em concentrações entre 10 μ M e 15 μ M e as construções variantes de XVIPCD eram adicionadas na seringa de titulação em concentração de 100 μ M a 200 μ M. Em seguida, alíquotas de XVIPCD eram adicionados em cada ponto da titulação na amostra contendo VirD4^{AAD}.

Construção	ΔH (K cal/mol)	K _d (nM)
XAC2609 ^{HIS}	-16,1 $\pm$ 0,2	303 $\pm$ 26
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD}	-14,5 $\pm$ 0,2	401 $\pm$ 49,5
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{H315A P316AD317A}	-18,1 $\pm$ 0,1	1818 $\pm$ 76
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{G336W}	-10,0 $\pm$ 0,1	793 $\pm$ 53
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{D363A}	11,1 $\pm$ 0,1	9174 $\pm$ 1490
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{F375A V377A}	ND	ND
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{D383A P384A}	ND	ND
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{A396M}	11,8 $\pm$ 0,1	746 $\pm$ 65
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{P400A}	10,8 $\pm$ 0,2	11312 $\pm$ 570
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{S426Ter}	-11,800 $\pm$ 0,2	660 $\pm$ 72
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{Q(397-431)A}	-8,5 $\pm$ 0,1	138 $\pm$ 46
XAC2609 ^{HIS-XVIPCD} ^{Q(397-431)S}	-9,2 $\pm$ 0,4	285 $\pm$ 52

Figura 41. Ensaio de secreção de XAC2609 sobre membrana de nitrocelulose. As cepas de *X. citri* utilizadas e construções de XVIPCDs estão descritas na porção superior do experimento. Na linha *X. citri* (C-) foram dispostas colônias de isoladas. O fenômeno de secreção de XAC2609 é evidenciado na linha em que foram dispostas as competições entre cepas de *X. citri* vs *E. coli*. *X. citri* lisada (C+) corresponde a colônias isoladas de *X. citri* que foram tratadas com tampão de lise bacteriana anterior a lavagem. Anti-XAC2609 corresponde a imunodeteção por Western Blot obtido a partir da fração total das células de *X. citri* utilizadas neste ensaio. Ensaio de ITC (Valores de Kd); gráfico de colunas indicando os valores de Kd correlacionados aos ensaios de secreção.

4.2.10 A atividade ATPase de VirD4 de *Xac* é essencial para a função do T4SS

Com o objetivo de verificar se a atividade ATPásica de VirD4 é importante para a função do T4SS, foram realizados alinhamentos de sequência entre VirD4 de *X. citri* com proteínas homólogas de VirD4 de outros T4SSs. Os alinhamentos indicaram que a K144 corresponde a lisina conservada presente na sequência consenso do motivo Walker A de VirD4 (Walker et al. 1982; Ramakrishnan et al. 2002). Na Figura 42, observa-se um ensaio de competição de *X. citri* selvagem (WT), cepa nocaute de virD4 (Δ VirD4), Δ virD4 complementada com VirD4 selvagem (Δ virD4 + VirD4), Δ virD4 complementada com VirD4 mutante K144T (Δ virD4 + VirD4K144T) e a cepa selvagem também expressando o VirD4 mutante K44T (merodiploide) contra *E. coli* expressando o gene *lacZ*. Observa-se que a coloração nas competições entre *E. coli* contra as cepas Δ virD4, Δ virD4+VirD4K144T e WT+VirD4K144T é predominantemente azul. Visto este fato, infere-se que a atividade ATPásica de VirD4 é importante para a função do T4SS e que a presença de uma ATPase defectiva exerce dominância negativa sobre a função do T4SS de *X. citri*.

Figura 42. Competição de bactérias *X. citri* vs *E. coli* expressando β -galactosidase em meio com LB-agar suplementado com X-gal e IPTG. A cepa selvagem (WT), cepa nocaute de *virD4* ($\Delta virD4$), $\Delta virD4$ complementada com *VirD4* selvagem ($\Delta virD4 + VirD4$), $\Delta virD4$ complementada com *VirD4* mutante K144T ($\Delta virD4 + VirD4K144T$) e a cepa WT complementada com o *VirD4K144T* (WT + $VirD4K144T$) estão notadas acima de cada coluna do experimento. A competição foi realizada ao longo de 24 horas em meio LB agar 1,5%, a 30°C.

4.3. Caracterização de um par de efetor/inibidor (XAC2609/XAC2610) do T4SS de *X. citri*

A Peptideoglicana (PG) é o principal componente da parede celular, e sua função é proteger as bactérias contra a pressão de turgor e manter a integridade do envelope celular bacteriano (Silhavy et al. 2010; Callewaert et al. 2012). Para proteger a PG da atividade de enzimas hidrolíticas, as bactérias produzem inibidores proteicos que ligam e eliminam a atividade das PG hidrolases (Callewaert et al. 2012). Um inibidor de PG hidrolase já caracterizado em bactérias gram-negativas, que exibe similaridade estrutural com XAC2610, é Plil-Ah (Van Herreweghe et al. 2010; Souza et al. 2015). Plil-Ah inibe a atividade da Lisozima *Tapes japonica* (TjL) de Bivalves marinhas e a sua importância biológica está associada adaptação bactéria-hospedeiro (Van Herreweghe et al. 2010). XAC2610 é predita ser uma lipoproteína e também exibe semelhança estrutural com a proteína de imunidade de Sistema de Secreção Tipo VI de *P. aeruginosa* (Tsi1). Tsi1 inibe a atividade da PG amidase de Tse1 e sua função biológica foi descrita para proteger as células de *P. aeruginosa* de um processo de auto-intoxicação intercelular mediado pela secreção do Tse1 através do T6SS (Russell et al. 2011).

Apesar de Tsi1, XAC2610 e Plil compartilharem relações estruturais, estas proteínas têm um baixo grau de similaridade de sequência (Souza et al. 2015). Portanto, podemos entender essas semelhanças e diferenças como um indício que apontam para aspectos universais ainda não descritos para essas proteínas. Adicionalmente, observamos a ausência de ensaios funcionais e biológicos que possam revelar vários aspectos não explorados de inibidores de PG hidrolases. Aqui descrevemos através de cepas *X. citri* com deleção no gene *xac2610* alguns aspectos funcionais relacionados sua função biológica e a sua correlação com XAC2609 e o T4SS de *X. citri*.

4.3.1 XAC2610 proporciona imunidade *in vivo* contra a atividade lítica de XAC2609

Em ensaio de crescimento de colônias, após 24 e 48 horas de cultivo não foi possível identificar diferenças de cor, rugosidade, transparência e tamanho de colônia entre *X. citri* $\Delta xac2610$ e a cepa selvagem. No entanto, após 72 horas de crescimento, nota-se que as colônias formadas pelos mutantes $\Delta xac2610$ e $\Delta xac2610\Delta virB7$ tornam-se transparentes. Para demonstrar isto, criamos um ensaio no qual é possível identificar uma imagem ilustrada sob a placa de cultura durante o tempo de cultivo (Figura 43A). A partir de 24 horas de cultivo é possível visualizar a imagem ilustrada abaixo de todas as colônias do ensaio. Com 48 horas de cultivo, devido ao crescimento bacteriano, não é mais visualizada a imagem ilustrada abaixo das colônias. No entanto, surpreendentemente, após 72 horas de crescimento é observado o reaparecimento da figura abaixo da colônia de $\Delta xac2610$ e do duplo mutante $\Delta xac2610\Delta virB7$. Entretanto, abaixo das colônia de *X. citri* selvagem (WT) e $\Delta virB7$ não é possível identificar a imagem. Nota-se também que as cepas complementadas $\Delta xac2610c$ e $\Delta xac2610c\Delta virB7$ reverterem o efeito da transparência. Adicionalmente, o duplo mutante $\Delta xac2610\Delta xac2609$ não apresenta o fenótipo de transparência da colônia.

Os ensaios de Western Blot (Figura 43B) mostram que $\Delta xac2610$ produz VirB7 e XAC2609, portanto assume-se que o T4SS é ativo nestas condições e a deleção de XAC2610 não interferiu na expressão de XAC2609. Além disso, a cepa mutante $\Delta xac2610\Delta xac2609$ é capaz de produzir VirB7 em quantidades similares ao observado na cepa *X. citri* selvagem. Nota-se que o duplo mutante $\Delta xac2610\Delta virB7$ mutante produz XAC2609 (Figura 43B), indicando que a produção de XAC2609 não

é alterada com a eliminação do canal de secreção do T4SS. Consequentemente, estes dados indicam que o fenótipo de colônias de transparência pode estar associado a um processo de autólise devido a atividade de XAC2609 na ausência de XAC2610 independentemente de um T4SS funcional.

Figura 43. Ensaio de transparência de colônias. **A)** Fotografias das colônias foram adquiridas em tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas de crescimento. *X. citri* Selvagem pBRA Φ GFP (WT), *X. citri* Δ virB7 GFP pBRA Φ (Δ virB7), *X. citri* Δ xac2610 pBRA Φ GFP (Δ xac2610), *X. citri* Δ xac2610+XAC2610 GFP (Δ xac2610^c), *X. citri* Δ xac2610 Δ virB7 pBRA GFP (Δ xac2610 Δ VirB7), *X. citri* Δ xac2610 Δ virB7 +XAC2610 GFP (Δ xac2610^c Δ VirB7) e *X. citri* Δ xac2610 Δ xac2609 GFP pBRA (Δ xac2610 Δ xac2609). **B)** Western Blot do extrato total de células de *X. citri*. As linhas correspondentes a imunodeteção com os anticorpos primários anti-XAC2610, anti-XAC2609 e anti-VirB7 estão indicadas na porção esquerda da Figura.

4.3.2 XAC2610 é importante para manter a integridade do envelope celular de *X. citri*

Com o objetivo de investigar se a deleção de *xac2610* pode sensibilizar o envelope celular de *X. citri*, foram realizados experimentos de microscopia óptica de fluorescência com as cepas de *X. citri* selvagem e $\Delta xac2610$ expressando GFP em meio suplementado de iodeto de propídeo (IP). Colônias de *X. citri* crescidas em meio LB agar 1,5% eram coletadas com o uso de palitos e ressuspendidas delicadamente em meio 2x TY contendo IP, então as células eram analisadas no microscópio imediatamente após a mistura. A Figura 44 mostra que ambas as cepas de *X. citri* (WT e $\Delta xac2610$) apresentam fluorescência proveniente da emissão do IP (vermelho) ao longo de todos os tempos de experimento. Nota-se que a morfologia celular da cepa WT é conservada tanto nas células vermelhas quanto nas células verdes. Entretanto, observando a cepa $\Delta xac2610$, nota-se que o envelope celular das células vermelhas está comprometido, este fato pode ser inferido devido a difusão da fluorescência vermelha que se expande através do envelope celular no tempo de 24 horas e que se intensifica ao longo dos tempos de 48 horas e 72 horas (Figura 44). O fenômeno de difusão da fluorescência vermelha observado na cepa de $\Delta xac2610$ pode ser entendido como um extravasamento do material genético bacteriano para o meio extracelular. Este fenótipo poder ser revertido pela adição de XAC2610 na cepa de $\Delta xac2610$ (Figura 45). Adicionalmente, foi observado que a cepa $\Delta xac2610\Delta virB7$ também apresenta um fenótipo de extravasamento de DNA já em tempos de até 24 horas de cultivo tal como observado na cepa nocaute de *xac2610* (Figura 45).

Figura 44. Ensaio de integridade de envelope celular de *X. citri* Selvagem pBRAΦ GFP (WT) e ΔXAC2610 (*X. citri* Δ*xac2610* pBRAΦ GFP) marcadas com GFP (verde) foram crescidas em meio LB agar 1,5 %. Colônias foram ressuspensas em meio 2x TY. Iodeto de propídeo (vermelho) (1μg/mL) foi adicionado imediatamente antes da observação no microscópio. A microscopia de fluorescência das imagens foram obtidas depois de 24, 48 e 72 horas de crescimento (os tempos de cada experimento estão notados acima de cada coluna). Imagens foram obtidas com uma magnificação de 100x. Imagens representativas das culturas celulares.

Figura 45. Ensaio de integridade de parede celular. *X. citri* Δ*xac2610* pBRAΦ GFP (Δ*xac2610*); *X. citri* Δ*xac2610*+*Xac2610* GFP (Δ*xac2610c*) e *X. citri* Δ*xac2610*Δ*virB7* pBRA GFP (Δ*xac2610*Δ*VirB7*), expressando GFP (verde) crescidas em meio LB agar 1,5%. Colônias foram ressuspensas em meio 2xTY contendo iodeto de propídeo (vermelho) após 24 horas de cultivo. Imagens foram obtidas com uma magnificação

de 100x . Imagens representativas das culturas celulares de *X. citri*.

Experimentos de microscopia óptica de contraste de fase evidenciaram a formação de esferoplastos em culturas de *X. citri* $\Delta xac2610$ (Figura 46). A formação de esferoplastos é um forte indicativo que $\Delta xac2610$ apresente uma parede celular defectiva em comparação a cepa selvagem de *X. citri*. Esse fenótipo não é observado na cepa selvagem de *X. citri* selvagem e na cepa duplo nocaute $\Delta xac2610\Delta xac2609$.

Figura 46. Fenótipo celular de esferoplastos em *X. citri* $\Delta xac2610$. Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase com magnificação de 100x. . Imagens representativas das culturas celulares de *X. citri* $\Delta xac2610$.

Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando as cepas de *X. citri* selvagem (WT) e $\Delta xac2610$ foram realizados com objetivo de estudar aspectos morfológicos na superfície celular decorrentes da deleção de *xac2610* (Figura 47). As micrografias mostram que as superfícies celulares da cepa $\Delta xac2610$ apresentam uma perda da morfologia bacilar, que é caracterizada por uma colapso do envelope celular. Infere-se que este fenótipo é devido a uma maior fragilidade da parede celular de $\Delta xac2610$. Esse resultado remete com o que é observado na Figura 46, na qual foi observado um fenótipo de esferoplasto celular evidenciando

uma fragilidade da parede celular da cepa $\Delta xac2610$.

Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Imagens de cepas de *X. citri* Selvagem pBRAΦ GFP (WT) e *X. citri* $\Delta xac2610$ pBRAΦ GFP ($\Delta xac2610$). Foram realizadas amplificação de 40.000x.

Com objetivo de investigar aspectos ultraestruturais associados a morfologia celular decorrentes da deleção de *xac2610*, foram realizados ensaios de TEM com as cepas selvagem (*X. citri* WT), nocaute de *VirB7* ($\Delta virB7$), nocaute de *xac2610* ($\Delta xac2610$), $\Delta xac2610$ complementada com *XAC2610* ($\Delta xac2610c$) e cepa duplo mutante de *xac2610* e *virB7* ($\Delta xac2610\Delta virB7$) (Tabela 16; Figuras 48; 49 e 50). Nesses experimentos foram observadas diferenças fenotípicas ao longo dos envelopes celulares e dos conteúdos intracelulares de cepas que codificam *XAC2610* (*X. citri* WT, $\Delta virB7$ e $\Delta xac2610c$) e cepas nocautes de *xac2610* ($\Delta xac2610$, $\Delta xac2610\Delta VirB7$).

Na Tabela 16 está sumarizado os resultados observados nas micrografias obtidas pelos experimentos de TEM. Foi possível identificar um fenótipo celular diferenciado que foi classificado como *célula aberta* (Figuras 48 49 e 50). Esse fenótipo é caracterizado pelo rompimento de uma parte do envelope celular e geralmente está flanqueado por vesículas e/ou estruturas colabadas. Nas Figuras, 48 e 49 nota-se que a cepa $\Delta xac2610$ apresenta o envelope celular comprometido e

que geralmente é ausente de conteúdo intracelular. Foram observadas 133 células abertas em um total de 3.489 analisadas nas cepas $\Delta xac2610$ e $\Delta xac2610\Delta virB7$ enquanto que nas cepa WT, $\Delta virB7$ este fenótipo foi observado apenas 14 vezes em um total de 3315 células observadas (Tabela 16). Nota-se que houve uma reversão do fenótipo observado para a cepa $\Delta xac2610c$, onde foram observadas 4 células abertas em um total de 1212 células analisadas.

Tabela 16. Análise das observações das micrografias de cepas de *X. citri* obtidas pela técnica de TEM. As micrografias apresentavam uma magnificação de 6000x, com uma barra de escala de 1 μ m. *X. citri* selvagem pBRA Φ GFP (*X. citri* WT); *X. citri* $\Delta virB7$ GFP pBRA Φ ($\Delta virB7$); *X. citri* $\Delta xac2610$ pBRA Φ GFP ($\Delta xac2610$); *X. citri* $\Delta xac2610$ + XAC2610 GFP ($\Delta xac2610c$); *X. citri* $\Delta xac2610\Delta virB7$ pBRA GFP ($\Delta xac2610\Delta VirB7$).

Tipo celular	<i>X. citri</i> WT	$\Delta virB7$	$\Delta xac2610$	$\Delta xac2610c$	$\Delta Xac2610\Delta VirB7$
Células totais	2640	675	2152	1212	1337
Totais de células abertas*	8	6	103	4	30
% células abertas	0,3%	0,8%	4,7%	0,3%	2,24%

* Exemplos de fenótipos de células abertas consta na Figura 48, 49 e 50.

Figura 48. Imagens de células exemplificando o fenótipo celular de células abertas observado em micrografias de $\Delta xac2610$ (células circuladas).

Figura 49. Micrografia eletrônica de transmissão correspondente à cepa $\Delta xac2610$. Em destaque flechas apontando para estruturas celulares comprometidas apresentando aberturas e formação de vesículas colabadas ao longo da superfície celular.

Na Figura 50, ao observar a cepa $\Delta xac2610$, nota-se uma célula cujo o envelope celular foi rompido ausente de seu conteúdo citoplasmático, nesta mesma célula observa-se uma estrutura filamentosa interna dissociada de sua porção externa. Numa célula vizinha observamos diversos filamentos tanto no meio extracelular quando intracelular (setas verdes), notando-se um efeito de afunilamento destes filamentos ao longo de uma região côncava presente no

envelope celular. Entretanto, ao observar a cepa WT, as células apresentavam tipicamente um envelope celular com conteúdo intracelular intacto. Não foram observados extravasamentos de estruturas filamentosas ao longo dos envelopes celulares na cepa selvagem de *X. citri*, tal como visto na cepa $\Delta xac2610$. Provavelmente, esses filamentos são moléculas de DNA extravasando para o meio extra celular, tal como evidenciado nos experimentos de microscopia com o uso de iodeto de propídeo (Figuras 44 e 45).

Figura 50. Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Imagens de cepas de *X. citri* selvagem (WT) e da cepa nocaute de *Xac2610* ($\Delta xac2610$). Células foram cultivadas por 12 horas em meio 2x TY anterior ao tratamento de fixação. Barra de escala de 500 nm com amplificação de 50.000x. Flechas amarelas apontam para uma estrutura filamentosa interna presente ao longo de todo envelope celular apresentando regiões dissociadas e associadas ao arcabouço celular. Flechas verdes apontando para uma região rica em filamentos presentes intra e extracelularmente.

4.3.3 Ensaio de viabilidade celular

Em seguida, foi questionado se os aspectos de morfologia da colônia e os danos da estrutura celular observados na cepa nocaute de *xac2610* podem ser correlacionados com a viabilidade celular. O ensaio de viabilidade celular em LB agar 1,5% (Figura 51A) mostra que até 48 horas de cultivo não são observadas diferenças de viabilidade celular entre *X. citri* selvagem (WT) e $\Delta xac2610$. No

entanto, após 72 horas e 96 horas de crescimento a cepa $\Delta xac2610$ apresenta uma menor viabilidade celular em comparação com a cepa *X. citri* selvagem. A viabilidade da cepa $\Delta xac2610$ foi restaurada com a complementação de XAC2610. O ensaio de crescimento celular em meio 2x TY sob agitação (Figura 51B) não indica diferenças na viabilidade celular entre as *X. citri* selvagem e $\Delta xac2610$ até 26 horas de cultivo. Também não foram observadas diferenças de viabilidade celular após 5 dias de cultivo em meio 2x TY sem agitação (Tabela 17) entre as estirpes *X. citri* Selvagem (WT), $\Delta xac2610$ e $\Delta xac2610$ complementada com XAC2610 ($\Delta xac2610c$).

A

B

Figura 51. Ensaios de viabilidade celular. A) Viabilidade de colônias em meio LB agar. *X. citri* Selvagem pBRAΦ GFP (cinza claro), *X. citri* $\Delta xac2610$ pBRAΦ GFP (cinza escuro) e *X. citri* $\Delta xac2610+XAC2610$ GFP (branca) foram cultivadas em placas de agar LB. Após 48 horas, 72 horas e 96 horas a 30 °C, as colônias foram ressuspensas em meios 2x TY e a viabilidade celular (unidades formadoras de colônia por mL (cfu / mL)) foi acessada através de ensaios de diluição em série em placas de agar LB. Barras de erros, desvio padrão; N = 3. B) Crescimento celular de *X. citri* Selvagem pBRAΦ GFP (WT), de *X. citri* $\Delta xac2610$ pBRAΦ GFP ($\Delta xac2610$) e *X. citri* $\Delta xac2610+XAC2610$ GFP ($\Delta xac2610c$) em meio 2x TY a 30 °C, 200 rpm. Alíquotas de cultura de células (500 μ L) foram tiradas a cada 6 horas de crescimento, depois realizaram-se diluições em série para avaliar o número de unidades formadoras de colônias por ml (cfu / mL). Erros barras, desvio padrão.; N = 3.

Tabela 17. Ensaio de viabilidade celular em meio 2x TY sem agitação a 30 °C. *X. citri* Selvagem pBRAΦ GFP (WT), de *X. citri* $\Delta xac2610$ pBRAΦ GFP ($\Delta xac2610$) e *X. citri* $\Delta xac2610+Xac2610$ GFP ($\Delta xac2610c$) em meio 2x TY a 30 °C.

Cepa viabilidade	(cfu/ml) tempo inicial	viabilidade (cfu/ml) 5 dias
WT	$2,1 \times 10^7 \pm 4,2 \times 10^6$	$4,8 \times 10^7 \pm 9,5 \times 10^6$
$\Delta xac2610$	$2,3 \times 10^7 \pm 7,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^7 \pm 7,3 \times 10^6$
$\Delta xac2610c$	$2,2 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^6$

Erros (+/-) desvio padrão; n= 3. Tempo inicial DO_{600nm}:0,05.

4.3.4 Ensaios de Biofilme

Em seguida, foram investigados possíveis efeitos fisiológicos associados com XAC2610. A Figura 52 mostra que *X. citri* $\Delta xac2610$ e $\Delta xac2610\Delta virB7$ não foram capazes de formar biofilme sobre superfícies de plástico após 5 dias de cultivo em meio 2x TY. Além disso, a cepa duplo mutante $\Delta xac2610\Delta xac2609$ apresenta um biofilme normal. Porém, $\Delta xac2610\Delta xac2609$ complementada com XAC2609 é

defeituosa na formação de biofilme. Portanto, todos os resultados acima indicam que a atividade de XAC2609 inibe a formação de biofilme na ausência de XAC2610, e que a abolição de biofilme é independentemente de um T4SS funcional. Adicionalmente, XAC2609Nt é capaz de abolir a formação de biofilme na cepa $\Delta xac2610\Delta xac2609$. Porém, a estirpe $\Delta xac2610\Delta xac2609$ complementada com XAC2609Nt defectiva no seu sítio de clivagem de peptideoglicana (Xac2609Nt E48A) apresentou um de biofilme tal como observado na cepa selvagem de *X. citri*. Logo, podemos inferir que a não formação de biofilme independe de um processo de fratricídio celular mediado pela secreção de XAC2609 entre células irmãs. Essa afirmação é baseada no que é visto nas Figuras 38 e 41, nas quais XAC2609 não é secretada para células-alvos na ausência do seu domínio XVIPCD. Portanto, o conjunto de resultados mostrados na Figura 52 indicam que XAC2610 confere imunidade para *X. citri* de contra efeitos líticos de XAC2609, independente de um T4SS funcional e de um mecanismo de fratricídio celular.

Figura 52. Ensaio de formação de biofilme. As cepas de *X. citri* expressando proteína GFP são indicadas acima de cada imagem de microscopia de fluorescência. As imagens foram obtidas com magnificações de 100x. *X. citri* Selvagem pBRAΦ GFP (WT); *X. citri* $\Delta virB7$ GFP pBRAΦ ($\Delta virB7$); *X. citri* $\Delta xac2610$ pBRAΦ GFP ($\Delta xac2610$); *X. citri* $\Delta xac2610$ + XAC2610 GFP ($\Delta xac2610c$); *X. citri* $\Delta xac2610\Delta virB7$ pBRA GFP ($\Delta xac2610\Delta VirB7$); *X. citri* $\Delta xac2610\Delta virB7$ + XAC2610 GFP ($\Delta xac2610c\Delta VirB7$); *X. citri* $\Delta xac2610\Delta xac2609$ GFP pBRA ($\Delta xac2610\Delta xac2609$); *X. citri* $\Delta xac2610\Delta xac2609$ + Xac2609FL GFP

($\Delta xac2610\Delta xac2609$ + XAC2609); *X. citri* $\Delta xac2610\Delta xac2609$ + Xac2609Nt GPF ($\Delta xac2610\Delta xac2609$ + XAC2609Nt) e *X. citri* $\Delta xac2610\Delta xac2610$ + XAC2609Nt^{E48A} GPF ($\Delta xac2610\Delta xac2609$ + XAC2609Nt E48A).

5. DISCUSSÃO

5.1 Aspectos da interação entre VirD4 e o domínio XVIPCD de XAC2609

Como descrito no capítulo de Introdução, foram observados por ensaios de duplo híbrido que VirD4 de *X. citri* interage com diversos XVIPCDs de *X. citri* (Alegria et al. 2005). A partir disto, investigar a interação de VirD4 de *X. citri* com um conjunto de proteínas de função hipotética denominadas XVIPs via um domínio hipotético que estavam associadas a um T4SS de função hipotética foi a razão do início deste projeto no Grupo do Professor Shaker Chuck Farah no ano de 2011. Durante os trabalhos desta tese, nosso grupo descobriu que os XVIPs são toxinas secretadas pelo T4SS de *X. citri* para dentro de outras bactérias, assim conferindo uma vantagem competitiva para esta espécie em encontros com outras espécies bacterianas (Souza et al, 2015). Consequentemente, os objetivos iniciais deste projeto - a investigação de aspectos biofísicos e funcionais da interação entre VirD4_{AAD} com o domínio XAC2609_{XVIPCD} de *X. citri*- se tornaram ainda mais relevantes.

Demonstramos que VirD4_{AAD} é um domínio enovelado em solução. Essa afirmação é baseada nos resultados observados pelas técnicas de SAXS (Figura 33) e RMN (Figura 35). A estrutura secundária calculada a partir do assinalamento dos deslocamentos químicos da cadeia principal de VirD4_{AAD} assim como a predição das estruturas secundárias indicaram a presença predominante de α -hélices ao longo deste domínio (Figura 36 e 37). Esses achados condizem com o observado na estrutura cristalográfica do AAD de TrwB (Gomis-Rüth et al. 2001).

VirD4_{AAD} foi caracterizado como um domínio monomérico em solução pelas técnicas de SAXS (Tabela 13) e cromatografia de exclusão molecular (Figura 32). Na estrutura cristalográfica, o hexâmero de TrwB é predominantemente estabilizado por interações intermoleculares entre domínios NBD (**N**ucleotide **B**inding **D**omain) de subunidades vizinhas e de algumas interações entre domínios AAD em subunidades vizinhas (Gomis-Rüth et al. 2001). Visto isso, poderíamos propor que as ligações cruzadas promovidas por glutaraldeído entre moléculas de VirD4_{AAD} (Figura 29), são indicativas de interações transientes entre os domínios adjacentes de AAD ao longo do hexâmero de VirD4. Interações transientes de natureza homotrópica e heterotrópica do AAD poderiam refletir uma dinâmica intrínseca no funcionamento de VirD4. Uma possibilidade, seria o domínio AAD modular a abertura e fechamento do canal formado pelo hexâmero de VirD4 de modo coordenado com a atividade ATPase desta proteína.

Os experimentos de desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular (Figura 30), cromatografia de filtração em gel analítica (Figura 32), SAXS (Figura 33C) e RMN (Figura 34) todos indicam que XAC2609_{XVIPCD} é um domínio desenovelado em solução. Resultados indicando que XAC2609_{XVIPCD} seja um domínio desenovelado foram também observados ao longo da Tese de Doutorado de Souza D. P (2010). Substratos de diferentes T4SSs foram descritos como desordenados, especificamente RalF de *Legionella pneumophila* e VirE2 de *Agrobacterium tumefaciens* (Amor et al. 2005; Dym et al. 2008; Alvarez-Martinez and Christie 2009). Nota-se também que existe uma tendência de desordem estrutural ao longo da extrema região C-terminal para diferentes substratos dos T4SSs em comparação com proteínas globulares (Figura 53). Possivelmente, uma grande flexibilidade estrutural na região do extremo C-terminal nos substratos dos T4SS

seja uma característica importante para o desenovelamento e passagem através do canal de secreção.

Figura 53. Tendência de desordem de proteínas globulares e de substratos do T4SS. Análise de tendência de desordem de sequência de substratos do T4SS pelo software MetaDisorderMD2 (Kozlowski and Bujnicki 2012). Foram analisados os 120 últimos resíduos de cada substrato indicado no gráfico. CagA (BAC10448.1) [*H. pylori*]; MobA (ACH81152.1) [*E. coli*]; TrwC (CAA44853.3) [*E. coli*]; VirE2 (AAL57029.1) ; TraA (AAC17212.1) [*A. fabrum str. C58*]. XAC2609 (AAM37458.1)[*X. citri*]. Proteínas globulares: Albumina (AAA98797.1) [Homo sapiens]; Citocromo C (NP_061820.1) [Homo sapiens]; Anidrase Carbônica (P00918.2) [Homo sapiens]; Beta-galactosidase (APQ22888.1) [*Escherichia coli*].

A interação entre XAC2609_{XVIPCD} e VirD4_{AAD} foi observada por diferentes ensaios realizados ao longo desta Tese. A purificação do complexo de VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} obtida pelo ensaio de *pull-down* por cromatografia de afinidade (Figura 28) e cromatografia de Filtração em Gel Analítica (Figura 32) indicam a formação de um complexo estável. Pelas técnicas de ligação cruzada por glutaraldeído (Figura 29), experimentos de SAXS e cromatografia de filtração em gel analítica (Figura 32), foi obtida uma informação da estequiometria de ligação de 1:1 para o complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD}. As titulações por RMN envolvendo o domínio ¹⁵N-VirD4_{AAD} mostram o aparecimento de novos picos, diminuição de intensidade de picos e também picos que não foram afetados concomitante a adição de ¹⁴N-2609_{XVIPCD} (Figura 35). Porém, também foi observado uma diminuição da

intensidade de sinal dos deslocamentos químicos para uma grande variedade de picos no espectro HSQC da titulação entre ^{15}N -VirD4_{AAD} e ^{14}N -2609_{XVIPCD}. Esse fenômeno foi caracterizado como um regime de troca intermediária de interação, que pode ser decorrente da formação de um complexo de alta massa molecular entre VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} (~30 KDa) para RMN. Nota-se que o regime de troca intermediária dificulta a determinação da região de interface de interação entre VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD}. Uma solução plausível seria o uso de mutantes de ^{14}N -2609_{XVIPCD} que interagem fracamente com ^{15}N -VirD4_{AAD} em experimentos de titulações monitorados por HSQC. Esses mutantes provavelmente poderiam deslocar o regime de troca intermediária para um regime de troca rápida de interação. No regime de troca rápida, são observadas mudanças suaves nas posições dos picos ao longo dos pontos de titulações, logo as regiões que estão associadas à interação podem ser facilmente identificadas com base no assinalamento da cadeia principal da proteína marcada. Um exemplo foi a identificação das regiões de oligomerização de VirB7 de *X. citri* (Souza et al. 2011).

Foi observado que XAC2609_{XVIPCD} tende a se enovelar concomitante a ligação com VirD4_{AAD}. De maneira indireta, essa informação foi obtida através da caracterização por cromatografia de exclusão molecular do complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD}, que apresenta massa molecular aparente menor do que o que foi observada pelo perfil de eluição de XAC2609_{XVIPCD} isolada. Através dos experimentos de SAXS (Figura 33) foi observado que o complexo VirD4_{AAD}-XAC2609_{XVIPCD} é enovelado. Experimentos de titulações monitorados por ^1H - ^{15}N HSQC indicam um enovelamento de XAC2609_{XVIPCD} concomitante a adição de ^{14}N -VirD4_{AAD}, particularmente na região de glutaminas e asparaginas do espectro HSQC. Uma outra evidência de que a região rica em glutaminas localizada na porção

extremo C-terminal dos XVIPCDs pode estar associada com o enovelamento foi visto pela técnica de CD (Figura 31). Neste ensaio foi observado que a construção XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} apresenta um maior conteúdo de estruturas secundárias em comparação com a construção XAC2609_{HIS-XVIPCD}. Uma possível explicação para entender essa indução de enovelamento na construção XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} pode estar associada ao fato de que alaninas são aminoácidos com uma alta propensidade a formar α -hélices enquanto glutaminas são consideradas indiferentes (Chou and Fasman 1974) (Fujiwara et al. 2012). Logo, concomitante a interação, a região rica de glutaminas do XVIPCDs poderia adotar uma estrutura α -hélice, tal como é indicado no espectro de CD de XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} (Figura 31). Uma hipótese, talvez o enovelamento da região extremo C-terminal nos sinais de secreção dos T4SSs pode ser um aspecto conservado em outros T4SSs. Nota-se que para alguns substratos dos T4SSs, a região extremo C-terminal desenovelada é essencial para a secreção, tal como nos últimos 20 aa de RalF do T4SS Icm/Dot de *L. pneumophila* (Nagai et al. 2005).

O domínio BID (**B**artonella *intracellular delivery*) é um sinal de secreção do T4SS encontrado em algumas relaxases de sistemas conjugativos e também em proteínas efetoras de T4SSs denominadas BEPs (**B**artonella-*translocated effector proteins*) (Schulein et al. 2005; Alvarez-Martinez and Christie 2009; Stanger et al. 2016). É descrito que as BEPs apresentam na porção N-terminal um domínio associado a função efetora e que a porção C-terminal de cada BEP apresenta pelo menos um domínio BID seguido de um curto trecho positivamente carregado ao longo da cadeia polipeptídica (Schulein et al. 2005). A característica de modularidade das BEPs com os BIDs, se assemelha com o que é observado para as proteínas XVIPs e os XVIPCDs. Como foi visto que XAC2609_{XVIPCD} tende a se

estruturar concomitante a interação com VirD4_{AAD} e com o aumento da força iônica e do pH do meio (Souza 2010), foi realizado uma predição da estrutura secundária para este domínio (Figura 54, 55). Na predição da estrutura secundária de XAC2609_{XVIPCD} com o programa Phyre2 (Kelley et al. 2015), e o alinhamento de estrutura secundária realizado pelo programa PRALINE (Simossis and Heringa 2005) a partir do N para o C terminal, são observadas duas alfa hélices, alguns trechos formadores de folhas β pregueadas seguida por duas α -hélices. Interessantemente, as estruturas cristalográficas dos domínios BIDs, a partir do N para o C terminal, são basicamente constituídos por três α -hélices, duas curtas regiões de folhas β pregueadas seguidas de duas α -hélices (Stanger et al. 2016). Nota-se, portanto que XAC2609_{XVIPCD} apresenta uma predição de estrutura secundária similar ao que é observado no domínio BID. Visto essas possibilidades de similaridades estruturais entre os domínios BIDs e XVIPCDs é possível supor a existência de um ancestral entre os BIDs e os XVIPCDs. Atualmente é proposto que o domínio BID seja originado evolutivamente de relaxases de sistemas de secreção conjugativos (Schulein et al. 2005).

```
>2609xvipcd
HPDNAMYNGAVSKLEALGRGGFANRKELEQAAGQIVFESKVSGLQRIDHVVPNKSGDCFFAVQGELTDPAMQRFVDRNQAQNPLENSSRQAAEESQRQAIQVQTQESAARRMSM
>4YK2
LSINEFIRKVVSDHSIQEQEKEIRRLSQIVTGNQNLANQLSQIHENPSFTKIISNTLTNSPESFAKLAGSKTFGIKNSKKQAEKNI SKIVEATHKYADAVENS MGNIIK
>4YK1
PPLKDEEVIEKIEINDACIQKSLKIRALSKLIYNNPEILLQDISHINANPMGRELSERIINSPKSI GRLKGRKTI GYIKSQKYKISEQNAKILSNEIFNYADKVSNI RCTLMREHKAKGRRLQIVKMPS
>4YK3
RMQHNPLVQAYQQEVMHWCKIVYGNSDVLKERMQEVLYQKPSSEGEDLSRQVAENPTSVHKLGRNLCGLKTNARRQAEEGFMHLCQALDGYTSAVTQAKENIKHVPQAEARRYGQESEQA
```

Figura 54. Predição de estrutura secundária para XAC2609_{XVIPCD}. As predições foram feitas com software Phyre2 (Kelley et al. 2015). As estruturas secundárias dos domínios BID das proteínas Bep9, BepE e Bep6 acordo as estruturas depositadas no banco de dados do PDB códigos 4YK2, 4YK3 e 4YK1 (Stanger et al. 2016), respectivamente. Em vermelho estão representadas α -hélices e em amarelo estão representados folha β pregueadas.

Figura 55. Alinhamento de predições de secundárias entre XAC2609_{XVIPCD} os domínios BIDs (PDB:4YK2, 4YK3 e 4YK1). Software utilizado PRALINE, método DSSP (Jones 1999) e PSIPRED (Buchan et al. 2013). Realçado em vermelho estão representados os resíduos formadores de α -hélices e em azul estão representados folha β pregueadas. (Notar que o software PSIPRED não preve a formação de folhas β pregueadas observadas nas estruturas cristalográficas 4Yk(1-3).)

VirD2 e PcfG são proteínas classificadas como relaxases e apresentam a função de processamento e ancoramento de um DNA alvo para ser translocado através de seus respectivos T4SS (Alvarez-Martinez and Christie 2009). Aspectos funcionais da interação do domínio AAD de VirD4 do T4SS de *A. tumefaciens* com VirD2 e o domínio AAD de PcfC de *E. faecalis* com PcfG também foram investigados (Whitaker et al. 2015). Nesse trabalho, as interações específicas de VirD4_{AAD}-VirD2 e PcfC_{AAD}-PcfG foram observadas por ensaio de *pull-down* por cromatografia de afinidade. Adicionalmente, foi observado que VirD4_{AAD} e PcfC_{AAD} ligam DNA de fita simples e de fitas duplas de modo inespecífico. Nota-se também que a atividade ATPase de TrwB do T4SS conjugativo R388 é dependente da interação com DNA (Tato et al. 2005). Até o presente momento, não temos evidência experimental de que VirD4_{AAD} de *X. citri* possa se ligar a DNA fita simples ou dupla. Também, não existem exemplos na literatura mostrando a interação de DNA e proteínas acopladoras de T4SS não-conjugativos (ou seja, que secretam somente efetores).

Contudo, a atividade de VirD4 de *X. citri* apresentou ser essencial para o funcionamento do T4SS (Figura 42). Nota-se que o mutante de VirD4 K1443 exerce uma função de dominância negativa para o T4SS. Em sistemas conjugativos, mutantes defectivos na atividade ATPásica também exercem efeitos de dominância negativa sobre a função do T4SS (Moncalián et al. 1999). Essas observações levantam a hipótese de que a interação específica entre o AAD de *X. citri* com o XVIPCD seguida do processo de estruturação do XVIPCD, tal como evidenciado nos experimentos de RMN podem ser importantes para a ativação de VirD4 de modo independentemente de interação com DNA. Para confirmar essa hipótese, experimentos de atividade ATPásica de VirD4 *X. citri* e experimentos de microscopia eletrônica pela técnica de *negative stain* foram iniciados. Porém, as primeiras análises das micrografias de *negative stain* das amostras purificadas de VirD4 apontaram uma grande contaminação por chaperonas nessas purificações (resultados não mostrados). Portanto, novas tentativas de purificação de VirD4 juntamente com o XVIPCD serão realizadas futuramente.

Experimentos de titulações monitorados por calorimetria isotérmica indicaram que alguns resíduos conservados ao longo do XVIPCD são importantes para interagir com o VirD4_{AAD} (Figura 40, Tabela 15). Nas titulações envolvendo os mutantes XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{H315A_P316A_D317A}, XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{D363A} e XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{P400A} apesar de continuarem a interagir com VirD4_{AAD}, nota-se um aumento da constante de afinidade para essas titulações. Por outro lado, não foram detectadas interações entre VirD4_{AAD} e as construções XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{D383A_P384A} e XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{F375A_V377A}.

Foram observadas regiões conservadas do XVIPCD de XAC2609 que não alteraram a interação com o AAD (Figura 40, Tabela 15). Surpreendentemente, a

substituição das glutaminas presentes na região rica em glutaminas por alaninas ou serinas promoveram uma sutil aumento na afinidade com o AAD. Nota-se também, uma diminuição da quantidade de calor liberado por mol de reação para XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)S} e XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A}. Como foi visto no espectro de CD de XAC2609_{HIS-XVIPCD}^{Q(397-431)A} (Figura 31) esta construção apresenta um maior grau de enovelamento ao nível de estrutura secundária. Logo, poderia ser inferido que uma parte do calor liberado devido à interação entre XVIPC e AAD poderia ser atribuído ao enovelamento do XVIPCD.

Abaixo, na Tabela 18, estão sumarizados os resultados de secreção e as constantes de afinidades de interação entre XAC2609_{XVIPCD} e VirD4_{AAD}. É observado que as mutações que mais aumentaram as constantes de dissociação Kd entre o domínio AAD e o XVIPCD também obstruíram o processo de secreção de XAC2609 via o T4SS. Portanto, podemos afirmar baseados nesses resultados que uma correta interação entre o XVIPCD e AAD é um passo essencial para a secreção via o T4SS de *Xanthomonas*.

Tabela 18. Constantes de dissociação e aspectos da secreção de XAC2609 dependente do T4SS.

Mutação no XVIPCD	Kd (nM)	X. citri produz?	Secreta ?
Selvagem	401 +/- 49.5	Sim	Sim
H315A P316AD317A	1818 +/- 76	Sim	Não
G336W	793 +/- 53	Sim	Sim
D383A P384A	--*	Sim	Não
A396M	746 +/- 65	Sim	Sim
P400A	1612 +/- 187	Sim	Não
S426Ter	660 +/- 72	Sim	Sim

* Interação muito fraca, portanto a Kd não poderia ser estimada.

5.2 Aspectos biológicos da função da proteína de imunidade XAC2610

Neste trabalho, apresentamos evidência que XAC2610 é importante para: i) proteger as colônias bacterianas contra processos autolíticos de uma maneira dependente do tempo, ii) manutenção da integridade do envelope celular, iii) viabilidade celular, e iv) formação de biofilme devido à atividade de XAC2609 de maneira independentemente de um T4SS funcional e de um processo de fratricídio celular.

O fenótipo de transparência de colônias dependente do tempo (Figura 43) observado nas estirpes $\Delta xac2610$ e $\Delta xac2610\Delta virB7$ é um forte indicativo de lise da parede celular de *X. citri* devido a atividade de XAC2609. Essa hipótese corrobora o que é observado em ensaios no quais são avaliados a diminuição da turbidez de uma suspensão de peptidoglicana (PG) após adição da lisozima (SHUGAR 1952; Mörsky 1983; Cançado et al. 2010). Também, é válido comentar que as atividades *in vitro* de XAC2609 e XAC2610 foram observadas : a porção N-Terminal de XAC2609 apresenta a atividade de hidrolisar PG e XAC2610 abole a atividade hidrolítica de XAC2609 (Souza et al. 2015). Através do ensaio de transparência de colônias foi evidenciado que XAC2610 protege *X. citri* independentemente da atividade do T4SS uma vez que VirB7 é essencial para a formação do canal do T4SS (Souza et al. 2011; Rivera-Calzada et al. 2013; Oliveira et al. 2016). Atualmente, assume-se que as proteínas de imunidade associadas aos Sistemas de Secreção Tipo VI com atividade antibacterianas são importantes para inibir um efeito de fratricídio celular (Russell et al. 2011; Dong et al. 2013) (Figura 10). Este modelo foi proposto baseado na observação de que em *Pseudomonas aeruginosa* as cepas nocautes dos inibidores Tsi1 e Tsi3 apresentam um crescimento defectivo na presença de um T6SS funcional, porém o crescimento era restaurado na cepa duplo nocaute do

T6SS e dos inibidores (Russell et al. 2011). Para *X. citri*, foram realizadas diversas tentativas que pudessem evidenciar a XAC2610 estar associada a função de inibir um fratricídio celular mediado pelo T4SS (dados não mostrados). Porém, até o presente momento, não temos evidências experimentais de que ocorra um ataque fratricida mediado pelo T4SS de *X. citri*. Visto estes fatos, os ensaios de transparências de colônias apontam para uma extensão da função biológica das proteínas de imunidade.

Análise empregando microscopias de contraste de fase, de fluorescência, eletrônica de transmissão e de varredura mostraram que a XAC2610 é importante para a manutenção da integridade do envelope celular em células *X. citri*. Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura são comumente utilizadas para caracterizar danos e mudanças ao longo do envelope celular de bactérias concomitante ao uso de lisozimas ou compostos químicos (Anderson & Johnson 1968; Warren et al. 1957; Voss 1964; Feliciano et al. 2012; Martinez et al. 2009). Porém, até a presente data, este é o primeiro trabalho a mostrar ao nível ultraestrutural a importância de uma proteína de imunidade de um Sistema de Secreção bacteriano estar associada a manutenção do envelope celular. As micrografias de microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 48, 49 e 50) das cepas nocautes de XAC2610 mostram a presença um grande número de células abertas cuja membranas estão fragmentadas e descontínuas; também sendo observadas células ausentes de conteúdo intracelular e extravasamento de material genético para o meio extracelular. Análises de microscopia eletrônica de varredura (Figura 47) também mostram que Xac2610 esteja associada a manter a integridade do envelope celular de *X. citri*. As micrografias de $\Delta xac2610$ revelam um fenômeno de colapso do envelope celular, um forte indicativo de que a parede celular desta

cepa esteja comprometida. Após 24 horas, 48 horas e 72 horas de crescimento em LB agar, nota-se células permeabilizadas de *X. citri* selvagem e $\Delta xac2610$ observadas por coloração de DNA com iodeto de propídeo adicionado imediatamente antes da observação no microscópio (Figuras 44 e 45). *X. citri* $\Delta xac2610$ apresenta um envelope celular danificado e existe um extravasamento do seu conteúdo intracelular, enquanto a cepa *X. citri* Selvagem não exhibe este fenótipo de extravasamento (Figuras 44 e Figura 45). Adicionalmente, são observados frequentemente o fenótipo de esferoplastos em células *X. citri* $\Delta xac2610$, indicando claramente que a parede celular de *X. citri* é comprometida neste nocaute (Figura 46).

Aspectos de viabilidade celular foram avaliados para a cepa *X. citri* $\Delta xac2610$, e foi observado uma diminuição da viabilidade celular em meio LB agar 1,5 % somente após 72 horas de cultivo (Figura 51). Esse resultado remete ao que observado nos experimentos de transparência de colônias de $\Delta xac2610$ e $\Delta xac2610virB7$ (Figura 43), no qual após 72 horas nota-se um efeito de transparência para estas cepas.

Observamos pela primeira vez que uma proteína de imunidade associada a proteger a peptidoglicana de bactérias seja importante para a formação do biofilme bacteriano (Figura 52). Foi observado que essa proteção ocorre de modo independentemente de um Sistema de Secreção funcional, haja vista a cepa duplo nocaute $\Delta virB7\Delta xac2610$ não formar biofilme. Também mostramos que o T4SS de *X. citri* não é essencial para a formação do biofilme (Figura 52), haja vista a formação de biofilme na cepa *X. citri* $\Delta virB7$. Observamos que a cepa de *X. citri* duplo nocaute $\Delta xac2610\Delta xac2609$ forma biofilme, mas quando complementada com XAC2609, ou somente o domínio N-terminal de XAC2609 ocorre a abolição do

biofilme. Esses resultados implicam que a não formação de biofilme ocorre de modo independente da presença do sinal de secreção e de um T4SS funcional. Nota-se que não foram observadas diferenças de viabilidade celular entre as cepas *X. citri* selvagem e $\Delta xac2610$ após 5 dias de crescimento sem agitação (Tabela 17). Podemos supor que os danos observados ao longo do envelope celular dos mutantes causam a inibição da formação de biofilme. Essa afirmação é também baseada em exemplos descritos para *Campylobacter jejuni* em que a manutenção da integridade da parede celular foi relacionada com a formação do biofilme (Iwata et al. 2016). E também no que é descrito para bactérias Gram-positivas, no qual distúrbios na parede celular corrompem a formação de biofilmes mas não interferem no estilo de vida planctônico bacteriano (Bucher et al. 2015). O biofilme bacteriano é descrito como uma matriz formada por bactérias e macromoléculas organizadas de tal forma que sua correta maturação depende de sistemas de secreção especializados, por exemplo o pílus tipo IV (Bahar et al. 2009; Dunger et al. 2014, 2016). Uma hipótese que podemos levantar é que a deleção de uma proteína de imunidade tal como XAC2610, pode afetar o funcionamento de complexos multiproteicos que se estendem ao longo do envelope celular, levando assim à inibição da formação de Biofilme. Para verificar essa informação, podem ser realizados ensaios de secreção de pilinas dependentes da atividade do Pílus Tipo IV no contexto de mutantes nocautes de *xac2610*.

Conforme descrito anteriormente, XAC2610 se localiza no periplasma celular e XAC2609 é uma proteína citoplasmática nativa que pode acessar o periplasma de uma célula-alvo após a secreção pelo T4SS. Portanto, há uma intrigante questão associada ao entendimento de como XAC2610 são capazes de proteger a célula *X. citri* independentemente de um T4SS funcional. Destacamos discutir e gerar

hipóteses que possam explicar este fenômeno. Uma possibilidade é baseada na observação que as cepas nocautes de *xac2610* apresentam um envelope celular defeituoso e exibem um grande extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular. Como consequência, o espaço extracelular é provavelmente um ambiente tóxico, devido ao excesso de Xac2609 e agentes permeabilizantes liberados concomitante a lise bacteriana. De fato, essa afirmação é baseada em experimentos de atividade de lisozima extracelular em bactérias Gram-negativas, nos quais são usados agentes quelantes como Lactoferrina ou EDTA para permeabilizar a membrana externa (Callewaert et al. 2012). Considerando também uma menor viabilidade da cepa *X. citri* $\Delta xac2610$ tempos de até 72 horas e 96 horas de cultivo em LB-agar, podemos hipotetizar um mecanismo sinérgico no qual após a lise de uma célula existe o extravasamento de XAC2609 para um conjunto de células vizinhas previamente suscetíveis a lise.

Falhas naturais na manutenção da biogênese da membrana ou de parede celular de *X. citri* podem explicar a observação do fenômeno de autólise celular (Figuras 43-50 e Tabela 16). Portanto XAC2610 localizada no periplasma pode proteger *X. citri* contra os efeitos tóxicos de vazamentos (intrínseco à natureza de *X. citri*) de XAC2609 citoplasmática para o periplasma.

Também, podemos considerar que etapas intermediárias na via de secreção ainda não descritas para o T4SS de *X. citri* possam estar envolvidas com este conjunto de fenótipos caracterizados neste trabalho (Figuras 43-52 e Tabela 16). Em *A. tumefaciens* a acumulação de substratos do T4SS no periplasma (Chen et al. 2000; Pantoja et al. 2002) corroboram para a hipótese de que os substratos citoplasmáticos são translocados primeiramente para o periplasma e então são acoplados ao canal do T4SS (Christie et al. 2014). Assumindo que esse processo

também ocorra na via de secreção do T4SS de *X. citri*, as proteínas de imunidade poderiam ter um papel importante associado à via de secreção das toxinas e também de proteção de *X. citri*. Portanto os fenótipos observados de autólise celular e de formação de biofilme bacteriano para a cepa $\Delta xac2610\Delta virB7$ e $\Delta xac2610$ seriam um indicativo de uma etapa da via de secreção no qual os efetores anterior ao acoplamento no canal do T4SS se localizam no periplasma de *X. citri*. Para melhor testar essa hipótese, estão em andamento experimentos com cepas duplos nocautes envolvendo $\Delta xac2610$ e outros componentes do T4SS associados as atividades energéticas (por exemplo $\Delta xac2610\Delta virD4$, $\Delta xac2610\Delta virB11$) e de formação do complexo de membrana interna do T4SS ($\Delta xac2610\Delta virB6$).

5.3 Outros T4SSs com atividades antibacterianas

Em Souza *et al*, 2015, foram identificados 500 XVIPs distribuídos em diversos genomas bacterianos, sendo que 498 pertenciam a família de *Xanthomonadaceae* e as outras duas restantes foram localizadas nos genomas de *Pseudomonas syringae* e *Catenibacterium mitsuokai*. Esse resultado foi obtido através do uso do software *PSI Blast* utilizando a sequência do domínio XVIPCD de XAC2609 como referência de busca inicial. Novas buscas por XVIPs utilizando a sequência do XVIPCD de XAC2609 mostram exemplares de XVIPs em espécies de bactérias que não foram identificados anteriormente. Nesta busca foram identificados 1966 proteínas homólogas de XVIPs, e como indicado anteriormente, as XVIPs são majoritariamente presentes em espécies da família de *Xanthomonadaceae* (Figura 56). Foram identificadas 70 proteínas homólogas de XVIPs nas famílias de *Neisseriaceae*, *Chromobacteriaceae* e algumas espécies de *Burkholderiales* cujas

famílias ainda não foram definidas. Portanto, para fim de praticidade, este grupo de proteínas identificadas em genomas de β - *Proteobacterias* será denominado de β -VIPs, e o domínio conservado de β -VIPCD.

Nos genomas das espécies que codificam as β -VIPs nota-se a presença de genes *virB7* homólogos de tal como o de *X. citri*. Em especial nas *VirB7* das espécies de *Neisseria flavescens* e *Neisseria sp. oral taxon*, são observados os resíduos essenciais para oligomerização e interação com *VirB9*, como tal como exemplificado nos trabalhos baseados em *VirB7* de *X. citri* (Souza et al. 2011; Oliveira et al. 2016).

Figura 56. Árvore de distribuição taxonômica de 1966 exemplares de XVIPs. Resultados obtidos com o software JACKHMMER (Finn et al. 2011). O domínio XVIPCD de XAC2609₃₁₅₋₄₃₁ foi utilizado como referência inicial para buscas de homólogos no banco de sequências do UNIPROT. Entre parênteses estão indicados os números de XVIPs identificados. Flechas indicam a quantidade de espécies de bactérias dentre as divisões taxonômicas denotadas na figura. As espécies de β -proteobacterias que codificam homólogos de XVIPs (β -VIPs) identificadas estão descritas abaixo, e entre parênteses estão indicados quantidade de β -VIPs identificadas por espécie: *Neisseria flavescens* (13), *Neisseria sp. HMSC064D07* (5), *Hydrogenophaga sp. LPB0072* (6), *Neisseria sp. HMSC070A01* (6), *Neisseria sp. HMSC069H12* (6), *Neisseria mucosa C102* (6), *Variovorax sp. Root318D1* (5), *Neisseria flavescens SK114* (4), *Neisseria sp. HMSC056A03* (3), *Chromobacterium aquaticum* (3), *Neisseria sp. HMSC071C03* (2), *Burkholderiales bacterium GWF1_66_17* (2), *Neisseria sp. HMSC06F02* (2), *Chromobacterium sp. 37-2* (2),

Morococcus cerebrosus (2), *Simonsiella muelleri* ATCC 29453 (2), *Neisseria sp. oral taxon 014 str. F0314* (1) e *Burkholderiales bacterium RIFCSLOWO2_02_FULL_67_64* (1).

Na Tabela 19 estão indicados os domínios N-terminais das β -VIPs citadas no parágrafo anterior e na Figura 56. Tal como observado para as XVIPs, a maioria das β -VIPs identificadas codificam domínios N-terminais hipotéticos cujas funções ainda não foram definidas, mas que provavelmente devem estar associadas à atividade antibacteriana. Porém, também foram identificados domínios Lipase 3, Domínio Ligação a cálcio, GH19 e Peptidase M23 assim como observados nas XVIPs. Diferentemente, nas β -VIPs são vistos os domínios GH24 e GH73 que estão associados atividade de clivar a peptidoglicana, mas que não são encontrados dentre as XVIPs.

Tabela 19. Domínios N-terminais encontrados em 70 β -VIPs identificados a partir da busca por homólogos do XVIPCD de XAC2609.

Domínio	Homólogo em <i>X. citri</i>	Nº de vezes identificadas
Hipotético	Não definido	42
DUF2974/Lipase 3	XAC0574/XAC2885	14
Domínio Ligação Ca	XAC1918	6
GH19	XAC2609/XAC0466	3
Peptidase M23	XAC0466	1
NpC_P60	Não encontrado	2
GH24	Não encontrado	1
GH73	Não encontrado	2

O Logotipo de sequência do β -VIPCDs está mostrado na Figura 57. Colorido em vermelho na Figura, estão alinhados o logotipo de sequência dos β -VIPCDs e os resíduos de XAC2609_{XVIPCD} que foram essenciais para a secreção e interação com VirD4_{AAD}. Observa-se, que todos os resíduos essenciais para a secreção de

XAC2609 e interação com VirD4_{AAD} também são conservados nos β -VIPCDs. Em roxo, estão os resíduos em comum nos β -VIPCDs e XAC2609_{XVIPCD}, nota-se a região rica em glutaminas na porção C-terminal e também resíduos positivamente carregados na porção extremo C-terminal, que é assinatura tipicamente observada nos sinais de secreção dos T4SSs. Contudo, colorido em verde musgo na Figura 56, constata-se a existência de diferentes resíduos conservados nos β -VIPCDs que não estão presentes no XVIPCD de XAC2609. Essas diferenças sinalizam uma divergência evolutiva em termos de diversidade de sequência na família dos XVIPCDs e β -VIPCDs. A partir disso, podemos imaginar a possibilidade da existência de outros sistemas de secreção antibacterianos, porém com sinais de secreção distintos do que é tipicamente observado para a família dos XVIPCDs. Essas diferenças tornam difícil a identificação desses homólogos através de técnicas de bioinformáticas baseadas apenas nas similaridades de sequencias.

Figura 57. Logotipo de sequência determinado a partir do alinhamento múltiplo de 70 β -VIPCDs. A altura do empilhamento indica a conservação da sequência em cada

posição, enquanto a altura do símbolo dentro do empilhamento indica a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição. Abaixo do logotipo de sequência, está a sequência primária de XAC2609_{XVIPCD}. Em vermelho, estão denotados resíduos que foram demonstrados serem importantes para interação com VirD4 e para a secreção do XVIPCD de XAC2609. Em roxo, estão denotados resíduos conservados no WebLogo de β -proteobacterias que também estão presentes nos XVIPCDs de *X. citri*. Em verde, indicam resíduos conservados que presentes em β -proteobacterias mas que não são observados na sequência do XVIPCD de XAC2609.

Uma questão de grande interesse é saber se além dos XVIPCDs do T4SS de *X. citri*, existem outros sinais de secreção que podem indicar T4SSs associados à guerra microbiana. Como descrito nos capítulos anteriores foram observadas similaridades em termos de tamanho e de estrutura secundária entre os XVIPCDs e o domínio BIDs. Nota-se que os BIDs estão amplamente distribuídos em proteínas Relaxases de sistemas de secreção conjugativos e em efetores tal como nas Beps de *B. henselae* (Schulein et al. 2005; Schröder et al. 2011; Alperi et al. 2013). A partir disso, utilizando como referência a sequência primária do domínio BID de Bep9 de *B. clarridgeiae*, cuja estrutura cristalográfica foi resolvida (código PDB 4YK2) (Stanger et al. 2016), foram realizadas buscas por homólogos nos bancos de dados de proteínas do UNIPROT com o uso do software JACKHMMER (Finn et al. 2011). Os resultados dessas buscas (Figura 58) indicaram assim como o esperado, a presença de domínios de proteínas Relaxases (MobA) e do domínio de filamentação induzida por α AMP (FIC) que estão comumente presentes nos efetores BEPs (Harms et al. 2017) seguidos de domínios BIDs ao longo dos trechos C-terminais dessas proteínas. Porém, surpreendentemente, foi observada a presença de 20 proteínas contendo um domínio N-terminal que codifica a toxina Zeta seguida de um domínio BID C-terminal distribuído em 20 espécies distintas de bactérias (Figura 58). A toxina Zeta é uma enzima que atua na fosforilação do precursor da parede celular uridina difosfato N-acetilglicosamina (UNAG). UNAG fosforilada inibe a atividade de MurA e consequentemente, inibe a via de síntese de peptideoglicana

na bactéria (Mutschler et al. 2011). Em bactérias, assume-se que a função de toxinas Zeta é importante para a manutenção e estabilidade de plasmídeos (Zielenkiewicz and Ceglowski 2005) e apresenta atividade bacteriostática contra bactérias gram-negativas. Porém, a presença de sinais de secreção do T4SS ao longo de sua porção C-terminal é um forte indicativo de que bactérias possam utilizar essa toxina para matar ou controlar o crescimento de células competidoras tal como foi mostrado para o T4SS de *X. citri*. Importante comentar que no trabalho da identificação da função do T4SS de *X. citri*, foram identificados XVIPs contendo o domínio toxina Zeta em cepas de *S. maltophilia* JV3 e AU12-09 (Souza et al, 2015).

Domain Architectures

Figura 58. Zeta toxinas com domínios BIDs C-terminais identificadas a partir de duas iterações com o software JACKHMMER (Finn et al. 2011). A sequência referencial de busca foi a sequência do domínio BID de *B. clarridgeiae* Bep9 (PDB 4YK2)(Stanger et al. 2016). Todas as sequências de proteínas inseridas no resultado apresentam uma faixa de *E-value* entre 1.1×10^{-6} a 6.4×10^{-16} . Os números internos sob a legenda "sequence" indica a quantidade de sequências identificadas por arquitetura de proteína. A direita da legenda "with domain architecture" estão indicados os domínios N-terminais conservados identificados em cada proteína. Também estão representados modelos esquemáticos por figuras geométricas simples de acordo com exemplo descrito para cada modelo. A barra preta abaixo cada modelo esquemático indica a localização de regiões homólogas do domínio BID de *Bartonella clarridgeiae* Bep9. Os exemplares de domínios Zeta toxinas estão

indicados abaixo, código *UNIPROT* seguido da espécie bacteriana cognata em parênteses: Q11MR3_CHESB (*Chelativorans* sp. (strain BNC1)), A0A0Q8FYB2_9RHIZ (*Rhizobium* sp. Root651), A0A1B9RTN2_9RHIZ (*Rhizobium* sp. AC27/9), A0A021WX31_9RHIZ (*Shinella* sp. DD12), A0A0T6ZZX7_RHIFR (*Sinorhizobium fredii* USDA 205), A0A0B7MJS7_RHIFH (*Rhizobium fredii* (strain HH103), A0A178XJZ7_9RHIZ (*Ensifer glycinis*), I3XGY1_RHIFR (*Sinorhizobium fredii* USDA 257), A0A021XE05_9RHIZ (*Shinella* sp. DD12), M5JT70_9RHIZ (*Ochrobactrum intermedium* M86), A0A1C7P8D4_9RHIZ (*Pararhizobium polonicum*), A0A1H8TCQ9_9RHIZ (*Rhizobium tibeticum*), A0A1C0SY20_9RHIZ (*Ensifer* sp. LC54), A0A1E3V7J4_9RHIZ (*Ensifer* sp. YIC4027), A0A0X7A7N0_9RHIZ (*Agrobacterium* sp. LY4), W1L7I9_RHIRD (*Agrobacterium radiobacter* DSM 30147), A0A0Q6EMY3_9RHIZ (*Aureimonas* sp. Leaf460), A0A0Q6DA91_9RHIZ (*Aureimonas* sp. Leaf427). A0A1S7S8E6_9RHIZ (*Agrobacterium genomosp.* 3 str. CFBP 6623), A0A1S7SAU1_9RHIZ (*Agrobacterium genomosp.* 5 str. CFBP 6626), A0A0Q6EMY3_9RHIZ(*Aureimonas* sp. Leaf460).

Um possível efetor de um T4SS identificado é a proteína Meso_4336, que contém um domínio N-terminal toxina Zeta (27-223) seguido de um domínio C-terminal BID (392-492) que apresenta identidade de sequência de 17%, 20% e 25% com 4YK3, 4yK1 e 4YK2 respectivamente (Figura 59A). Meso_4336 é codificada no plasmídio pBNC1 de *Chelativorans* sp. BNC cujo genoma está anotado no banco de genomas do Kegg (Figura 59B). O gene de *meso_4336* se encontra dentro do *locus* onde está codificado os componentes de um T4SS. Além disso, na vizinhança de *meso_4336*, nota-se genes de funções desconhecidas, *meso_4337* e *meso_4335*. Análises de sequência indicam que Meso_4337 seja uma lipoproteína e codifique um domínio DUF2218 na sua porção C-terminal. Uma coincidência interessante é que Meso_4337 e XAC2611 apresentam 164 resíduos em suas cadeias polipeptídicas, 20% de identidade de sequência, PIs entre 8~9 e são ricas em cisteínas, no caso XAC2611 apresenta oito cisteínas na sua cadeia principal enquanto Meso_4337 têm seis. E adicionalmente, baseado em previsões de estruturas secundárias e alinhamento de sequência (Figura 59C), Meso_4337 e XAC2611 são muito parecidas em termos de arquitetura de estrutura secundária. Notar que a expressão episomal de XAC2611 exerce um forte efeito negativo na

função do T4SS de *X.citri* (Figura 22). Logo, seria então Meso_4337 uma proteína homóloga de XAC2611 presente no T4SS do plasmídeo pBNC1-1 ? Meso_4335 é codificada na região a montante de Meso_4336, tal como observado na arquitetura do *operon* bicistrônico das proteínas XVIPs(X-Tfes)/XTfis de *X. citri* (exemplo : XAC2610/XAC2609) (Souza et al. 2015), logo, seria então Meso_4335 a proteína de imunidade de Meso_4336? Essas respostas poderiam ser somente acessadas por ensaios experimentais.

A) Meso_4336 ZETA-BID

>Meso_4336_597aa|

```
MADEATLGRLESEAQNEHIFRTEILPDVLPDDIGKADRPTLIVLGGQPGSGKTALLTASLT
ELEETGPAIRVVGGDILRSYHPGFVAHQNADFMASRFTQADAGINSEKLLTAATGRGVHV
VFETTMRTPDNVEKIMTAGRSAGYRIEARVLAVSSRVSWQCHYRFEELHAGAAARIPP
RAVHDAAVTGLAESLERIERKLSRVLIQRPDGEAVYDNLVSNQNRRAAMARQVLEET
RSRPLSREEDIDAFALVWAKVVDMEARSAPASLLDEVKAHSRDDLANFLADRRSDDDDA
MKTAREVKQRIGIDRSPIIPGGEDPLARPLVRDREEKFERQVRPGEVLIPOGDVDPDSE
AEICITLQCSRLQKRSERIERLSQVLYGNAATSAVESIDGMAAGSVAGQDTRAGKLE
FVHGEGGRFLRAESPERQTAHKLQDLAAMEDYGRTVDEFERQLETKHREEQRQRQGEI
RAISVGLTALLQAPAEQAARLHAAPQLRRELDGIASSINRRLTPSDRNALKSGDLRLS
RNLAVPHERVATLARVQSQVQAVHGQTQLQRQQLERGRNAGISIKR
```

```
Meso_4336 ARICGKLRSSRLQKRSERIERLSQVLYGNAATSAVESIDGMAAGSVAGQDTRAGKLE
4YK3 ---DRMQHNP LVQAYQQEYHMKCKLYVYNSDVLREPMQVILQK---PSEGEDLSRQVAE
4YK1 REVIEKTEENACTQKSEKTRALSKLYNPFETLEQDISHNAN---PMQRELSRRIIN
4YK2 NEFIRKVVSDHSIQEQEKIRRLSQIVFGNQNLQANQLSQIHEN---PSPTKILSNTLTN
Meso_4336 RQFLQPMAGGGRFLRAESPERQTAHKLQDLAAMEDYGRTVDEFERQLETKHREEQRQRQGEI
4YK3 NPTSVHKLGR---NLGLKTNARRQAEQGMHLQALDGYTSVATQAGNIGHVQAEAR
4YK1 SPKSIQRLKGR---KIGYIKSQYKISEQNAKILSNEIFNTADKVSINRCTIMREHKAKGR
4YK2 SEESFAKLGS---KTFGIKNSIKRQAEKMSKLVIAIKYADAVENSMGNIKKNNAEQK
Meso_4336 RQFLQPMAGGGRFLRAESPERQTAHKLQDLAAMEDYGRTVDEFERQLETKHREEQRQRQGEI
4YK3 RYQGESQRA---
4YK1 RLLQTVMPES---
4YK2 RLQSVLELPSD---
DLDRLSRNLAVPHERVATLARVQSQVQAVHGQTQLQRQQLERGRNAGISIKR
```

B)

C)

```

XAC2611 10 20 30 40 50
M 128 135 ILLVSHAP AFATACPAAG VAPGSPQCGP DSGTSRDDIP
XAC2606 ---MK---FI LLIFLPSSSA AHQATACPSG VAPGSPQCGP DSGTSRGDIP
Meso_4337 MRARQDP HFR KLDHLNKTAR RARSASLPV HFATNLSCG-----TS

XAC2611 60 70 80 90 100
TPPPRPTG EW IKTWGAIAGS DSTGEAGTAA GELS EDKAKD IAIIRCSVNG
XAC2606 QPPRPTG E W LKTWGAIASS -DNGD TGSST GKLS ENEARV EALKVCSDFG
Meso_4337 RSAERCLRRH TSNE ACLTVS -----EGE HLAQSNLAL ACYCREQRE

XAC2611 110 120 130 140 150
ASDCKINLVY RNQEAALVST ---QSD--- SFYQG SATKE RAIDLAIGNC
XAC2606 NSDCKVNFTY KNQCVAVVQA ---AKGR TG KIIISAATEE IAKKDALDEC
Meso_4337 GD--DLILEL DSSRAIRPV PGM LWRVDA SLLTCIGTK MLLESALRAS

XAC2611 160 170 180
KRSRSGECKV LYS ---DC SDPIKKY--- HELIX (H) STRAND (E)
XAC2606 LNESGAKCYV RGT ---DC SKPFRKF---
Meso_4337 REDAPRHVLW VQAEHEPFAA VRAVIQSGQI TAY
```

Figura 59. A) Na esquerda, está a sequência primária em formato FASTA de Meso_4336, realçado em ciano (27-223) corresponde a região que codifica a toxina Zeta (PFAM E-value = 6.9×10^{-60}), realçado em verde (392-492) corresponde a região que codifica o domínio BID. Na parte direita da figura, está a região de alinhamento

de sequência entre Meso_4336 e as sequências primárias de domínios BIDs de acordo com as estruturas cristalográficas código PDB :4YK1, 4YK2 e 4YK3 (Stanger et al. 2016) com o software Clustal Omega (Sievers et al. 2011). B) Operon do T4SS do T4SS do plasmídeo pBNC1-1 de *Chelativorans sp. BNC1*. Fonte KEGG: (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_genomemap?ORG=mes&ACCESSION=Meso_4336) C) Alinhamento de predições de secundárias entre XAC2611, XAC2606 e Meso_4337 utilizado o programa PRALINE, método DSSP (Jones 1999) e PSIPRED (Buchan et al. 2013). Realçado em vermelho estão representados os resíduos formadores de α -hélices e em azul estão representados folha β pregueadas.

Visto a possibilidade de encontrar domínios tóxicos com atividades antibacterianas fusionadas a sinais e secreção C-terminais, foram realizadas novas tentativas para atingir esta meta. Após diversas tentativas, foi identificado uma relaxase de *Caballeronia concitans* (codigo uniprot [A0A158HXB1](#)), que nesta Tese será denominada como SAL48777. Baseado em análises de estrutura secundária, nota-se que a porção C-terminal de SAL48777 codifica uma região com similaridades estruturais ao domínio BID de Bep9 de *B. clarridgeiae* (PDB 4YK2) (Figura 60).

Figura 60. Similaridades de estrutura secundária entre a porção C-terminal de

SAL48777 (SAL48777₅₈₅₋₇₃₇) e o domínio BID de Bep9 de *B. clarridgeiae* (PDB 4YK2). A) Alinhamento de estrutura secundária entre SAL48777 e o domínio BID (código PDB 4YK2). Formação de α -hélices (*Helix*) e folhas betas pregueadas (*Strand*) estão realçadas em vermelho e azul respectivamente. A região sublinhada foi considerada similar ao o que é observado no domínio BID de Bep9 de *B. clarridgeiae*. B) Sequência primária em formato FASTA de SAL48777, sublinhado corresponde a região 585-737 que foi utilizada como referência de busca com o software JACKHMMER (Finn et al. 2011) na Figura 61. Vermelho indica a formação de α -hélices na cadeia primária da sequência. Alinhamento de predições de secundárias entre foi realizada com programa PRALINE, método DSSP (Jones 1999) e PSIPRED (Buchan et al. 2013).

Empregando a região C-terminal (585-737) de SAL48777 (SAL48777₅₈₅₋₇₃₇) como referência de busca no site JACKHMMER (Finn et al. 2011), foi possível identificar a presença de diversas proteínas contendo um domínio tóxico N-terminal seguido de um trecho C-terminal tal como observado na relaxase SAL48777 (Figura 61). Na Figura 61, percebe-se que a grande maioria dos domínios N-terminais encontrados são de função desconhecidas, mas também são identificados domínios de toxinas Zeta, Relaxases (incluindo SAL48777), DUF2974, DUF2235, Fic e HipA_C. Notar que as XVIPS XAC2885 e XAC0574 de *X. citri* também codificam um domínio DUF2974 associado a função de Lipase 3 e que nosso grupo já identificou XVIPs em outras espécies que contêm o domínio DUF2235 (Souza et al, 2015).

Domain Architectures

Figura 61. Identificação de substratos dos T4SSs com domínios Tóxico N-terminal. Resultado obtido a partir de nove iterações com o software JACKHMMER. A sequência primária de SAL48777₅₈₅₋₇₃₇ foi utilizada como referência de busca. Os números internos sob a legenda "sequence" indicam a quantidade de sequências de proteínas identificadas por arquitetura. Também estão representados por modelos

esquemáticos exemplos de arquiteturas das proteínas identificadas. Nota-se o código UNIPROT indicado pela legenda "example", E-value de cada exemplo está indicado na parte direita inferior de cada linha da figura. As barras pretas abaixo de cada modelo esquemático indicam a regiões de similaridades de sequência com SAL48777₅₈₅₋₇₃₇.

Na Figura 62 está um logotipo de grau de conservação de sequência da região C-terminal desse conjunto de proteínas identificadas. Alguns resíduos altamente conservados são glicina na posição 9; histidina na posição 31; tirosina na posição 50 e uma região positivamente carregada na porção extremo C-terminal, o que indica uma assinatura tipicamente observada nos sinais de secreção dos T4SSs.

Figura 62. Logotipo de sequência obtido a partir do alinhamento de sequência da porção C-terminal das proteínas indicadas na Figura 56. A altura do empilhamento indica a conservação da sequência em cada posição, enquanto a altura do símbolo dentro do empilhamento indica a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição. Resultado de acordo com o que é visualizado diretamente no web site do software HMMER (Finn et al. 2011).

Nota-se a presença deste domínio em espécies de α - β - γ - δ - Proteobactérias, porém majoritariamente em β -Proteobactérias. Como exemplo, em *Neisseria gonorrhoeae* foi identificada a presença nove proteínas, dos quais oito delas codificam um domínio de toxina Zeta N-terminal. Na Figura 63, o alinhamento de sequência indica que a região C-terminal destas proteínas em *Neisseria gonorrhoeae* é altamente conservada. O T4SS GGI (*gonococcal genetic island*) de *N. gonorrhoeae* é relacionado a maquinaria de T4SSs conjugativos e também apresenta uma proteína acopladora (homólogo de VirD4) associada a reconhecer

genes *xac2197* e *xac2198* são preditos a codificarem possíveis domínios tóxicos (Jalan et al. 2011). XAC2198 é predita a codificar um domínio Lipase 3 na sua porção N-terminal e apresenta cerca de 35% e 26% de identidade de sequência com as proteínas XVIPs do T4SS de *X. citri*, XAC2885 e XAC0574, respectivamente. CdxE e CdxD são proteínas efetoras dos sistema antibacteriano CDZ de *C. crescentus*, (García-Bayona et al. 2017). Um aspecto em comum de XAC2198 e XAC2197 com as toxinas do sistema CDZ é a presença de motivos contendo a sequência GXXXGXXXG que são formadores de zipperes de glicina (Kim et al. 2005). Além disso, na vizinhança dos componentes do T1SS e de XAC2198, nota-se presença de dois genes hipotéticos, *xac2200* e *xac2199*. Análises de sequência predizem que XAC2199 seja uma lipoproteína de localização periplasmática e também que compartilhe cerca de 20% de identidade de sequência com a XAC0573, inibidora da XVIP XAC0574 (Souza et al. 2015). Este fato sugere que XAC2199 possa ser uma proteína de imunidade associada ao T1SS. Um aspecto conservado de sistemas dos sistemas secreção antibacteriano é a presença de proteínas de imunidades, logo surge a hipótese de que o T1SS de *X. citri* também estar associado a ter uma atividade antibacteriana. Similar ao o que é observado para o sistema CDZ de *C. crescentus*, o T1SS de *X. citri*, poderia apresentar uma atividade associada a combater o crescimento de bactérias proximamente relacionadas.

5.5 Considerações Finais

Por fim, neste trabalho foram levantadas evidências de que o operon *vir* do T4SS de *X. citri* está completo, foi observado que os genes *xac2613* e *virB11* são essenciais para a função do T4SS. Também foram observados aspectos

regulatórios associados a função de XAC2611, que surpreendentemente, a expressão epissomal inibe fortemente a função do T4SS de *X.citri*. Também, a adição de uma VirD4 defectiva de sua atividade ATPase exerceu um fenótipo de dominância negativa sobre a atividade do T4SS de *X. citri* selvagem. A partir desses resultados, novos trabalhos que investiguem aspectos da dinâmica e de diferentes questões relacionadas ao funcionamento dos T4SS de *X. citri* podem ser iniciados.

6. CONCLUSÕES

Uma das questões centrais desta Tese concerne o entendimento das interações entre uma toxina, XAC2609, secretada pelo T4SS de *X. citri*, seu inibidor cognato a lipoproteína XAC2610, e a proteína acopladora VirD4, responsável pelo reconhecimento das toxinas do T4SS. Aqui definimos que: 1) XAC2609 é uma proteína efetora do T4SS de *X. citri* 2) VirD4 é a proteína acopladora do T4SS. 3) A interação formada entre VirD4-XAC2609 é essencial para secreção via o T4SS. 4) XAC2610 é uma proteína de imunidade. 5) A interação XAC2609-XAC2610 é importante para proteção de *X. citri* contra efeitos tóxicos da atividade de XAC2609. 6) A atividade ATPase de VirD4 é necessária para o funcionamento do T4SS e mutantes que abolem esta atividade conferem um fenótipo de dominância negativa na cepa selvagem de *X. citri*. 7) As subunidades VirB5 e VirB11 são essenciais para o funcionamento deste sistema. 8) A proteína XAC2611 exerce um efeito negativo sobre a atividade do T4SS de *X. citri*.

Mostramos que a interação XAC2609-VirD4 é mediada pelos domínios XVIPCD de XAC2609 e AAD de VirD4. VirD4_{AAD} é um domínio enovelado rico em α -hélices e XAC2609_{XVIPCD} é um domínio desenovelado que se enovela concomitante

a interação com VirD4_{AAD}, formando um heterodímero em solução. Através de análises de sequência *in silico*, ensaios de interação proteína-proteína *in vitro* e de secreção *in vivo*, foi evidenciado que resíduos conservados presentes no domínio XVIPCD de XAC2609 são importantes para interação com VirD4_{AAD} e para sua secreção via o T4SS.

Diferentes técnicas experimentais *in vivo* mostram que na presença de XAC2609, XAC2610 é importante para a proteção do envelope celular, viabilidade e formação de biofilme bacteriano. Esses resultados exemplificam que a deleção de uma única proteína de imunidade cognata de um XVIP afeta drasticamente aspectos fisiológicos da morfologia celular, ultra estrutura, e de viabilidade celular em *X. citri*.

Os estudos aqui relatados sobre as interações da XAC2609 com XAC2610 e com VirD4 foram muito importantes para nosso entendimento do funcionamento deste novo tipo de T4SS com atividade bactericida, primeiramente descrito pelo nosso grupo em *X. citri*. O modelo funcional é caracterizado pela secreção de uma família de proteínas denominadas XVIPS que ocorre de modo dependente de: i) um domínio XVPCD; ii) um T4SS funcional; e iii) contato célula-célula, culminando na morte rápida da célula-alvo.

7. REFERÊNCIAS

- Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CHI, et al. 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* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2013 Jun 13];187(7):2315–25. Available from: <http://jlb.asm.org/content/187/7/2315.long>
- Alperi A, Larrea D, Fernández-González E, Dehio C, Zechner EL, Llosa M. A translocation motif in relaxase *trwC* specifically affects recruitment by its conjugative type IV Secretion System. *J Bacteriol* [Internet]. 2013 Nov [cited 2013 Nov 28];195(22):4999–5006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995644>
- Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2013 Aug 8];73(4):775–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946141>
- Aly KA, Baron C. The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*. 2007;153(11):3766–75.
- Amor JC, Swails J, Zhu X, Roy CR, Nagai H, Ingmundson A, et al. The Structure of RalF, an ADP-ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor from *Legionella pneumophila*, Reveals the Presence of a Cap over the Active Site. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Jan 14 [cited 2017 May 2];280(2):1392–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520000>
- Anderson L, Johnson RC. Electron Microscopy of Immune Disruption of *Leptospires* : Action of Complement and Lysozyme. 1968;95(6):2293–309.
- Aoki SK, Pamma R, Hernday AD, Bickham JE, Braaten BA, Low DA, et al. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Sci (New York, NY)* [Internet]. 2005 [cited 2016 Oct 17];309(5738):1245–8.
- Atmakuri K, Cascales E, Christie PJ. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004 Dec [cited 2013 Aug 12];54(5):1199–211. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554962>
- Babu MM, Priya ML, Selvan AT, Madera M, Gough J, Aravind L, et al. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol* [Internet]. 2006 Apr 15 [cited 2017 May 26];188(8):2761–73. Available from: <http://jlb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.188.8.2761-2773.2006>

- Backert S, Fronzes R, Waksman G. VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends Microbiol.* 2008;16(9):409–13.
- Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2006 Apr [cited 2013 Aug 30];9(2):207–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16529981>
- Bahar O, Goffer T, Burdman S. Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(8):909–20.
- Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* [Internet]. 2012 Mar 8 [cited 2013 Aug 17];483(7388):182–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10846>
- Bayliss R, Harris R, Coutte L, Monier A, Fronzes R, Christie PJ, et al. NMR structure of a complex between the VirB9/VirB7 interaction domains of the pKM101 type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007 Jan 30 [cited 2017 May 16];104(5):1673–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244707>
- Benz J, Meinhart A. Antibacterial effector/immunity systems: It's just the tip of the iceberg. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Oct 17];17(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581686>
- Bergey DH (David H, Krieg NR, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology* [Internet]. Baltimore MD: Williams & Wilkins; 1984 [cited 2017 May 16]. Available from: <http://www.worldcat.org/title/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology/oclc/9042846>
- Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2017 May 26];41(Web Server issue):W349–57. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt381>
- Bucher T, Oppenheimer-Shaanan Y, Savidor A, Bloom-Ackermann Z, Kolodkin-Gal I. Disturbance of the bacterial cell wall specifically interferes with biofilm formation. *Environ Microbiol Rep* [Internet]. 2015 Dec [cited 2016 Oct 28];7(6):990–1004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26472159>
- Büttner D, Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2010 Mar [cited 2013 Aug 14];34(2):107–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925633>
- Cabezón E, de la Cruz F. TrwB: An F1-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation. *Res Microbiol.* 2006;157(4):299–305.

- Cabezón E, Sastre JI, de la Cruz F. Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet* [Internet]. 1997 Apr 28 [cited 2017 May 10];254(4):400–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180693>
- Callewaert L, Van Herreweghe JM, Vanderkelen L, Leysen S, Voet A, Michiels CW. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. *Trends Microbiol* [Internet]. 2012;20(10):501–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.005>
- Cançado FC, Barbosa JARG, Marana SR. Role of the triad N46, S106 and T107 and the surface charges in the determination of the acidic pH optimum of digestive lysozymes from *Musca domestica*. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* [Internet]. 2010;155(4):387–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.01.001>
- Cao Y, Hallet B, Sherratt DJ, Hayes F. Structure-function correlations in the XerD site-specific recombinase revealed by pentapeptide scanning mutagenesis. *J Mol Biol* [Internet]. 1997;274(1):39–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398514>
- Cascales E, Atmakuri K, Sarkar MK, Christie PJ. DNA Substrate-Induced Activation of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 Type IV Secretion System. 2013;195(11):2691–704.
- Cascales E, Christie PJ. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* [Internet]. 2004 May 21 [cited 2013 Aug 14];304(5674):1170–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3882297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Waksman G, Navaza J, et al. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* [Internet]. 2009 Dec 24 [cited 2013 May 27];462(7276):1011–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2797999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chen L, Li CM, Nester EW. Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of virB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):7545–50.
- Chen Y, Zhang X, Manias D, Yeo HJ, Dunny GM, Christie PJ. Enterococcus faecalis PcfC, a spatially localized substrate receptor for type IV secretion tinn of the pCF10 transfer intermediate. *J Bacteriol*. 2008;190(10):3632–45.
- Cheung M-S, Maguire ML, Stevens TJ, Broadhurst RW. DANGLE: A Bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. *J Magn Reson* [Internet]. 2010 Feb [cited 2016 Sep 1];202(2):223–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015671>

- Chou PY, Fasman GD. Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* [Internet]. 1974 Jan [cited 2017 May 4];13(2):211–22. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00699a001>
- Christie PJ, Cascales E. Structural and dynamic properties of bacterial Type IV secretion systems (Review). *Mol Membr Biol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 Aug 25];22(1–2):51–61. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/09687860500063316>
- Christie PJ, Whitaker N, González-Rivera C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014 Aug [cited 2014 Oct 1];1843(8):1578–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389247>
- Cianfanelli FR, Monlezun L, Coulthurst SJ. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends Microbiol* [Internet]. 2016;24(1):51–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005>
- Costa TRD, Ilangovan A, Ukleja M, Redzej A, Santini JM, Smith TK, et al. Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex. *Cell* [Internet]. 2016;166(6):1436–1444.e10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.025>
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* [Internet]. 2004 Jun [cited 2016 Oct 11];14(6):1188–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173120>
- Danka ES, Garcia EC, Cotter PA. Are CDI Systems Multicolored, Facultative, Helping Greenbeards? *Trends Microbiol* [Internet]. 2017 May [cited 2017 May 19];25(5):391–401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.008>
- Delaglio F, Grzesiek S, Vuister G, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* [Internet]. 1995 Nov [cited 2014 Dec 15];6(3). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00197809>
- Disque C, Dreiseikermann B. The cytoplasmic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD in The Cytoplasmic DNA-Binding Protein TraM Binds to the Inner Membrane Protein TraD In Vitro. *J Bacteriol*. 1997;179(19):6133–7.
- Dodero VI, Quirolo ZB, Sequeira MA. Biomolecular studies by circular dichroism. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Aug 27];16:61–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196159>
- Dong TG, Ho BT, Yoder-Himes DR, Mekalanos JJ. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(7):2623–8. Available from: <http://www.pnas.org/content/110/7/2623>

- Draper O, César CE, Machón C, de la Cruz F, Llosa M. Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Nov 8 [cited 2013 Sep 3];102(45):16385–90. Available from: <http://www.pnas.org/content/102/45/16385.long>
- Dunger G, Guzzo CR, Andrade MO, Jones JB, Farah CS. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Type IV Pilus Is Required for Twitching Motility, Biofilm Development, and Adherence. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* [Internet]. 2014;27(10):1132–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1094/>
- Dunger G, Llontop E, Guzzo CR, Farah CS. ScienceDirect The *Xanthomonas* type IV pilus. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2016 Apr [cited 2017 Apr 10];30:88–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26874963>
- Durand E, Waksman G, Receveur-Brechot V. Structural insights into the membrane-extracted dimeric form of the ATPase TraB from the *Escherichia coli* pKM101 conjugation system. *BMC Struct Biol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Aug 25];11(1):4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3032639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dym O, Albeck S, Unger T, Jacobovitch J, Branzburg A, Michael Y, et al. Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Aug 12 [cited 2017 May 2];105(32):11170–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2516231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Feliciano L, Lee J, Pascall MA. Transmission Electron Microscopic Analysis Showing Structural Changes to Bacterial Cells Treated with Electrolyzed Water and an Acidic Sanitizer. *J Food Sci*. 2012;77(4).
- Fernández-González E, de Paz HD, Alperi A, Agúndez L, Faustmann M, Sangari FJ, et al. Transfer of R388 derivatives by a pathogenesis-associated type IV secretion system into both bacteria and human cells. *J Bacteriol* [Internet]. 2011 Nov [cited 2013 Sep 4];193(22):6257–65. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3209219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ferreira H, Sherratt D, Arciszewska L. Switching catalytic activity in the XerCD site-specific recombination machine. *J Mol Biol* [Internet]. 2001 [cited 2017 May 10];312(1):45–57. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002228360194940X>
- Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011;39(Web Server issue):W29–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3125773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Jan 4 [cited 2017 May 26];44(D1):D279-85. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv1344>
- Franke D, Svergun DI. DAMMIF , a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* [Internet]. 2009 Jan 24 [cited 2014 Dec 15];42(2):342–6. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?aj5117>
- Fronzes R, Schäfer E, Wang L, Saibil HR, Orlova E V, Waksman G. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* [Internet]. 2009 Jan 9 [cited 2013 Aug 25];323(5911):266–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3396474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fujiwara K, Toda H, Ikeguchi M. Dependence of alpha-helical and beta-sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Struct Biol* [Internet]. 2012;12(1):18. Available from: <http://bmcstructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-12-18>
- García-Bayona L, Guo MS, Laub MT. Contact-dependent killing by *Caulobacter crescentus* via cell surface-associated, glycine zipper proteins. *Elife* [Internet]. 2017 Mar 21 [cited 2017 May 24];6:3355–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28323618>
- Gomis-Rüth FX, Coll M. Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(9):839–43.
- Gomis-ruth FX, Moncalia G, Cruz F De, Coll M, Gomis-Rüth FX, Moncalián G, et al. Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2013 Apr 25];277(9):7556–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748238>
- Gomis-Rüth FX, Moncalián G, Pérez-Luque R, González A, Cabezón E, De La Cruz F, et al. The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2017 Apr 5];409(6820):637–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214325>
- Greated A, Lambertsen L, Williams PA, Thomas CM. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* [Internet]. 2002 Dec [cited 2017 May 16];4(12):856–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12534468>
- Greenfield N, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* [Internet]. 1969 Oct [cited 2013 Aug 27];8(10):4108–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5346390>

- Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* [Internet]. 2006a [cited 2017 Apr 6];1(6):2527–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406506>
- Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* [Internet]. 2006b Jan [cited 2013 Aug 9];1(6):2876–90. Available from: [/pmc/articles/PMC2728378/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2728378/?report=abstract)
- Guglielmini J, Néron B, Abby SS, Garcillán-Barcia MP, La Cruz DF, Rocha EPC. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(9):5715–27.
- Hachani A, Lossi NS, Filloux A. A visual assay to monitor T6SS-mediated bacterial competition. *J Vis Exp* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Oct 1];(73):e50103. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3639552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Harms A, Segers FHID, Quebatte M, Mistl C, Manfredi P, Körner J, et al. Evolutionary Dynamics of Pathoadaptation Revealed by Three Independent Acquisitions of the VirB/D4 Type IV Secretion System in *Bartonella*. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2017;9(3):761–76. Available from: <https://academic.oup.com/gbe/article-lookup/doi/10.1093/gbe/evx042>
- Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* [Internet]. 1972 Aug [cited 2017 Apr 6];48(2):422–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4115981>
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Püls, J., Plano, G. V, Haas, R., & Fischer, W. (2006). A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Molecular Microbiology*, 59(5), 1624–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05050.x>
- Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: The bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014;15(1):9–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.008>
- HOLZWARTH G, DOTY P. THE ULTRAVIOLET CIRCULAR DICHROISM OF POLYPEPTIDES. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1965 Jan 20 [cited 2013 Aug 27];87:218–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14228459>
- Hood RD, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl MA, Trinidad RRS, et al. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host Microbe*. 2010;7(1):25–37.
- Hoppert Michael HA. *Electron Microscopy in Microbiology (Microscopy Handbooks)*. Academic Press; 1998.

- Ilangovan A, Kay CWM, Roier S, El Mkami H, Salvadori E, Zechner EL, et al. Cryo-EM Structure of a Relaxase Reveals the Molecular Basis of DNA Unwinding during Bacterial Conjugation. *Cell* [Internet]. 2017;169(4):708–714.e12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417304233>
- Iwata T, Watanabe A, Kusumoto M, Akiba M. Peptidoglycan acetylation of *Campylobacter jejuni* is essential for maintaining cell wall integrity and colonization in chicken intestine. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2016;82(20):6284–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27520822>
- Jalan N, Aritua V, Kumar D, Yu F, Jones JB, Graham JH, et al. Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. *J Bacteriol*. 2011;193(22):6342–57.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* [Internet]. 1999 Sep 17 [cited 2017 Apr 5];292(2):195–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493868>
- De Jong MF, Sun YH, Den Hartigh AB, Van Dijl JM, Tsolis RM. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol*. 2008;70(6):1378–96.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* [Internet]. 2015 Jun 7 [cited 2017 May 26];10(6):845–58. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim S, Jeon T-J, Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bowie JU. Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2005;102(40):14278–83. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501234102>
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris M a, Roop RM, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* [Internet]. 1995 Dec 1;166(1):175–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529885>
- Kozlowski LP, Bujnicki JM. MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2012 May 24 [cited 2017 May 2];13(1):111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624656>
- Lang S, Gruber K, Mihajlovic S, Arnold R, Gruber CJ, Steinlechner S, et al. Molecular recognition determinants for type IV secretion of diverse families of conjugative relaxases. *Mol Microbiol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2013 Dec 13];78(6):1539–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143323>
- Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009;106(11):4154–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0813360106>

- Llosa M, Zunzunegui S, de la Cruz F. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(18):10465–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=193584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, Braun N, Connery S, Dujeancourt A, et al. Structure of a type IV secretion system. *Nature* [Internet]. 2014 Mar 24 [cited 2014 Mar 21];508(7497):550–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670658>
- Lu J, Wong JJW, Edwards RA, Manchak J, Frost LS, Glover JNM. Structural basis of specific TraD-TraM recognition during F plasmid-mediated bacterial conjugation. *Mol Microbiol*. 2008;70(1):89–99.
- Ma LS, Hachani A, Lin JS, Filloux A, Lai EM. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014;16(1):94–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.002>
- Martinez JG, Waldon M, Huang Q, Alvarez S, Oren A, Sandoval N, et al. Membrane-targeted synergistic activity of docosahexaenoic acid and lysozyme against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* [Internet]. 2009;419(1):193–200. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-62749086345&partnerID=tZOtx3y1>
- Moncalián G, Cabezón E, Alkorta I, Valle M, Moro F, Valpuesta JM, et al. Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Dec 17 [cited 2017 May 4];274(51):36117–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593894>
- Mörsky P. Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: reexamination of reaction conditions. *Anal Biochem* [Internet]. 1983 Jan [cited 2016 Oct 26];128(1):77–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6846802>
- Mutschler H, Gebhardt M, Shoeman RL, Meinhart A. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol*. 2011;9(3).
- Mylonas E, Svergun DI, IUCr, S. R, H. van den HR, B. C, et al. Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. *J Appl Crystallogr* [Internet]. 2007 Feb 17 [cited 2017 Apr 6];40(s1):245–9. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S002188980700252X>

- Nagai H, Cambronne ED, Kagan JC, Amor JC, Kahn RA, Roy CR. A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the Legionella RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Jan 18 [cited 2013 Sep 5];102(3):826–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=545534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* [Internet]. 2000;302(1):205–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283600940427>
- Oliveira LC, Souza DP, Oka GU, Lima F da S, Oliveira RJ, Favaro DC, et al. VirB7 and VirB9 Interactions Are Required for the Assembly and Antibacterial Activity of a Type IV Secretion System. *Structure* [Internet]. 2016;24(10):1707–18. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096921261630226X>
- Pantoja M, Chen L, Chen Y, Nester EW. Agrobacterium type IV secretion is a two-step process in which export substrates associate with the virulence protein VirJ in the periplasm. *Mol Microbiol*. 2002;45(5):1325–35.
- Parker C, Meyer RJ. The R1162 relaxase/primase contains two, type IV transport signals that require the small plasmid protein MobB. *Mol Microbiol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2013 Aug 19];66(1):252–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17880426>
- de Paz HD, Larrea D, Zunzunegui S, Dehio C, de la Cruz F, Llosa M. Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. *J Bacteriol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2013 Aug 14];192(11):2655–69. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2876477&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Perozzo R, Folkers G, Scapozza L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res* [Internet]. 2004 Feb [cited 2017 Apr 7];24(1–2):1–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15344878>
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* [Internet]. 2011 Sep 29 [cited 2017 May 26];8(10):785–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.1701>
- Petoukhov M V., Franke D, Shkumatov A V., Tria G, Kikhney AG, Gajda M, et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* [Internet]. 2012 Mar 15 [cited 2013 Aug 7];45(2):342–50. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889812007662>
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera : A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* [Internet]. 2004 Oct [cited 2017 Apr 28];25(13):1605–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.20084>

- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Jan 31 [cited 2017 May 18];103(5):1528–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432199>
- Putnam CD, Hammel M, Hura GL, Tainer JA. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation : defining accurate macromolecular structures , conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* [Internet]. 2007 Aug 14 [cited 2017 Apr 17];3(3):191–285. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078545>
- Ramakrishnan C, Dani VS, Ramasarma T. A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Eng Des Sel* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2017 May 4];15(10):783–98. Available from: <https://academic.oup.com/peds/article-lookup/doi/10.1093/protein/15.10.783>
- Ripoll-Rozada J, Zunzunegui S, de la Cruz F, Arechaga I, Cabezón E. Functional Interactions of VirB11 Traffic ATPases with VirB4 and VirD4 Molecular Motors in Type IV Secretion Systems. *J Bacteriol*. 2013;195(18):4195–201.
- Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, Chandran V, Lian PW, Laeremans T, et al. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J* [Internet]. 2013 Apr 17 [cited 2013 May 29];32(8):1195–204. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3630358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* [Internet]. 1987 [cited 2017 Feb 10];56(1):125–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3315856>
- Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* [Internet]. 2011 Jul 21 [cited 2013 Nov 14];475(7356):343–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3146020&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Russell AB, LeRoux M, Hathazi K, Agnello DM, Ishikawa T, Wiggins PA, et al. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* [Internet]. 2013;496(7446):508–12. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12074>
- Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2014 Jan 2 [cited 2016 Oct 17];12(2):137–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3185>
- Russell AB, Singh P, Brittnacher M, Bui NK, Hood RD, Carl MA, et al. A Widespread Bacterial Type VI Secretion Effector Superfamily Identified Using a Heuristic Approach. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2012;11(5):538–49. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312812001242>

- Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Aug 6];9(5):344–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478901>
- Schägger H. Tricine–SDS-PAGE. *Nat Protoc* [Internet]. 2006;1(1):16–22. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.4>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Jun 28 [cited 2016 Nov 3];9(7):676–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743772>
- Schröder G, Krause S, Zechner EL, Yeo H, Lurz R, Waksman G, et al. TraG-Like Proteins of DNA Transfer Systems and of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System : Inner Membrane Gate for Exported Substrates ? TraG-Like Proteins of DNA Transfer Systems and of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System : Inner M. *Society*. 2002;184(10):2767–79.
- Schröder G, Lanka E. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* [Internet]. 2005 Jul [cited 2013 Aug 22];54(1):1–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15907535>
- Schröder G, Schuelein R, Quebatte M, Dehio C. Conjugative DNA transfer into human cells by the VirB/VirD4 type IV secretion system of the bacterial pathogen *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011;108(35):14643–8. Available from: <http://www.pnas.org/content/108/35/14643.full>
- Schuelein R, Guye P, Rhomberg TA, Schmid MC, Schröder G, Vergunst AC, et al. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Jan 18 [cited 2017 May 2];102(3):856–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15642951>
- Schwarz S, West TE, Boyer FF, Chiang W-CC, Carl MA, Hood RD, et al. *Burkholderia* type vi secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. Christie PJ, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Aug 26 [cited 2016 Oct 23];6(8):77–8. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1001068>
- Segura RL, Aguila-Arcos S, Ugarte-Urbe B, Vecino AJ, de la Cruz F, Goñi FM, et al. The transmembrane domain of the T4SS coupling protein TrwB and its role in protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2013 Jun 10];null(null):2015–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23735543>
- SHUGAR D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1952 Mar [cited 2016 Oct 26];8(3):302–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14934741>

- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2011 Oct 11 [cited 2017 May 26];7:539. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988835>
- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2010 May;2(5):a000414. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2857177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- da Silva a CR, Ferro J a, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* [Internet]. 2002 May 23;417(6887):459–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12024217>
- Simossis VA, Heringa J. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2017 Jun 9];33(Web Server):W289–94. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki390>
- Skou S, Gillilan RE, Ando N. Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat Protoc* [Internet]. 2014;9(7):1727–39. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2014.116>
- Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* [Internet]. 1988 [cited 2017 Apr 13];67(1):31–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378111988900054>
- Souza DP, Andrade MO, Alvarez-Martinez CE, Arantes GM, Farah CS, Salinas RK. A component of the *Xanthomonadaceae* type IV secretion system combines a VirB7 motif with a N0 domain found in outer membrane transport proteins. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Aug 25];7(5):e1002031. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3093366&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Souza DP De. Estudos Estruturais e de Interações Proteína-Proteína Envolvendo Componentes de um Sistema de Secreção do Tipo IV de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; 2010.
- Souza DP, Oka GU, Alvarez-Martinez CE, Bisson-Filho AW, Dunger G, Hobeika L, et al. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Mar 6 [cited 2016 Oct 12];6:6453. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms7453>
- Stanger FV, de Beer TAP, Dranow DM, Schirmer T, Phan I, Dehio C. The BID Domain of Type IV Secretion Substrates Forms a Conserved Four-Helix Bundle Topped with a Hook. *Structure*. 2016;1–9.

- Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* [Internet]. 1986 May 5 [cited 2017 Feb 10];189(1):113–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3537305>
- Svergun DI. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. Wellman B, Haythornthwaite C, editors. *J Appl Crystallogr* [Internet]. 1992 Aug 1 [cited 2015 Feb 9];25(4):495–503. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?wi0087>
- Tato I, Zunzunegui S, de la Cruz F, Cabezon E. TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Jun 7 [cited 2015 Dec 3];102(23):8156–61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1149453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tiffany ML, Krimm S. Circular dichroism of the polypeptide chain. *Biopolymers*. 1969;8(3):347–59.
- Trocter M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, Waksman G. Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2014;27(1):16–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.006>
- Uversky VN. Size-Exclusion Chromatography in Structural Analysis of Intrinsically Disordered Proteins. In: *Intrinsically Disordered Protein Analysis* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2012 [cited 2017 Apr 16]. p. 179–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22821524>
- Van Herreweghe JM, Vanderkelen L, Callewaert L, Aertsen A, Compennolle G, Declerck PJ, et al. Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(7):1177–88.
- Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E. Characterization of Protein–Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. In: *Protein-Protein Interactions* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2004 [cited 2017 Apr 7]. p. 035–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064448>
- Venjaminov SYu, Baikalov IAA, Shen ZMM, Wu CSCS, Yang JTT, Venjaminov SY. Circular Dichroic Analysis of Denatured Proteins: Inclusion of Denatured Proteins in the Reference Set. *Anal Biochem* [Internet]. 1993 Oct [cited 2013 Aug 27];214(1):17–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1450>
- Vergunst AC, van Lier MCM, den Dulk-Ras A, Stüve TAG, Ouwehand A, Hooykaas PJJ, et al. 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* [Internet]. 2005 Jan 18 [cited 2013 Sep 4];102(3):832–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=545537&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Volkov V V., Svergun DI. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* [Internet]. 2003 Apr 16 [cited 2014 Dec 15];36(3):860–4. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889803000268>
- Voss JG. Lysozyme Lysis of Gram-Negative Bacteria Without Production of Spheroplasts. *J Gen Microbiol*. 1964;35(1964):313–7.
- Voth DE, Howe D, Beare P a, Vogel JP, Unsworth N, Samuel JE, et al. The *Coxiella burnetii* ankyrin repeat domain-containing protein family is heterogeneous, with C-terminal truncations that influence Dot/Icm-mediated secretion. *J Bacteriol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2014 Jul 27];191(13):4232–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2698476&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2014 Oct 20];59(4):687–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15815974>
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* [Internet]. 1982 [cited 2017 May 4];1(8):945–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6329717>
- Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2013 Aug 9];12(9):1203–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3070162&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- WARREN GH, GRAY J, YURCHENCO JA. Effect of polymyxin on the lysis of *Neisseria catarrhalis* by lysozyme. *J Bacteriol*. 1957;74(6):788–93.
- Whitaker N, Chen Y, Jakubowski SJ, Sarkar MK, Li F, Christie PJ. The All-Alpha-Domains of Coupling Proteins from the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/VirD4 and *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded Type IV Secretion Systems Confer Specificity to Binding of Cognate DNA Substrates. *J Bacteriol* [Internet]. 2015;197(May):JB.00189-15-. Available from: <http://jb.asm.org/content/early/2015/04/28/JB.00189-15.abstract>
- El Yacoubi B, Brunings AM, Yuan Q, Shankar S, Gabriel DW. In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2017 May 17];73(5):1612–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220258>

- Yeo H-J, Yuan Q, Beck MR, Baron C, Waksman G. Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(26):15947–52. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/100/26/15947>
- Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2008;9:40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215316> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2245901>
- Zielenkiewicz U, Ceglowski P. The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *J Bacteriol*. 2005;187(17):6094–105.

8. LISTA DE ANEXOS

ANEXO I-

LINK : microscopia *TIME LAPSE* morte rápida de célula alvo dependente do T4SS

<https://www.nature.com/article-assets/npg/ncomms/2015/150306/ncomms7453/extref/ncomms7453-s2.mov>

ARTICLE

Received 5 Sep 2014 | Accepted 29 Jan 2015 | Published 6 Mar 2015

DOI: 10.1038/ncomms7453

Bacterial killing via a type IV secretion system

Diorge P. Souza¹, Gabriel U. Oka¹, Cristina E. Alvarez-Martinez^{1,2}, Alexandre W. Bisson-Filho¹, German Dunger¹, Lise Hobeika¹, Nayara S. Cavalcante³, Marcos C. Alegria^{1,†}, Leandro R.S. Barbosa⁴, Roberto K. Salinas¹, Cristiane R. Guzzo^{1,5} & Chuck S. Farah¹

Type IV secretion systems (T4SSs) are multiprotein complexes that transport effector proteins and protein-DNA complexes through bacterial membranes to the extracellular milieu or directly into the cytoplasm of other cells. Many bacteria of the family Xanthomonadaceae, which occupy diverse environmental niches, carry a T4SS with unknown function but with several characteristics that distinguishes it from other T4SSs. Here we show that the *Xanthomonas citri* T4SS provides these cells the capacity to kill other Gram-negative bacterial species in a contact-dependent manner. The secretion of one type IV bacterial effector protein is shown to require a conserved C-terminal domain and its bacteriolytic activity is neutralized by a cognate immunity protein whose 3D structure is similar to peptidoglycan hydrolase inhibitors. This is the first demonstration of the involvement of a T4SS in bacterial killing and points to this special class of T4SS as a mediator of both antagonistic and cooperative interbacterial interactions.

ANEXO II

Article

Structure

VirB7 and VirB9 Interactions Are Required for the Assembly and Antibacterial Activity of a Type IV Secretion System

Graphical Abstract

Authors

Luciana Coutinho Oliveira,
Diorge Paulo Souza,
Gabriel Umaji Oka, ..., Rolf Boelens,
Chuck Shaker Farah,
Roberto Kopke Salinas

Correspondence

diorge@iq.usp.br (D.P.S.),
chsfarah@iq.usp.br (C.S.F.),
roberto@iq.usp.br (R.K.S.)

In Brief

Oliveira et al. show that tight binding of VirB7 to VirB9 is essential for assembly of the antibacterial type IV secretion system (T4SS) in the citrus pathogen *Xanthomonas citri*, whereas removal of the non-canonical VirB7 C-terminal domain, or impairment of VirB7 self-association, does not perturb assembly but abolishes T4SS activity.