UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Caracterização bioquímica de interações proteína-
proteína relacionadas com o mecanismo de *quorum-sensing*
do *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Maxuel de Oliveira Andrade

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo

06/07/2006

Dedico essa Dissertação a todos aqueles que me apoiaram durante minha caminhada. Em especial aos meus pais, Ivanete e Miguel, ao meu irmão, Wando, e aos meus avôs Geraldo Lopes e Edith.

Agradeço em especial ao Chuck, Lourdes e Sara que me receberam carinhosamente quando cheguei a São Paulo para prestar o exame de ingresso na Pós-graduação.

Agradecimentos,

Ao Prof. Dr. Chuck Farah, pela orientação, receptividade e amizade.

Aos amigos do laboratório de Proteínas: Ângela, Cássia, Cláudia, Cristiane, Diorge, Fernando, Paola, Robert, Alessandra, Ilda, Dona Cleuza pelo companheirismo, e pelas discussões científicas e filosóficas.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular de Plantas: Alex, Carlos, Elaine e Juliana.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular: Andréia, Daniela (Dicty), Daniela Beton, Juliana (a menina do *Dictyostelium*), Leandro, Robson, Patrícia, Paulo Zaine e Paulo (Brasília).

Aos Professores Ronaldo Quaggio, Aline Maria da Silva, Frederico Guerreiros e Marilis do Valle pelas discussões e pela ajuda na realização da parte experimental desse trabalho.

Ao Júlio Oliveira (UNESP-Jaboticabal) pela ajuda na realização dos experimentos de patogenicidade do mutante de *Xac*.

Aos professores da UFV Dra. Elizabeth Fontes, Dr. Lúcio Campos, Dra. Elza Fernandes e Dr. Everaldo Barros que me mostraram o caminho da ciência.

Aos meus amigos irmãos Chico (Certinho-arrumadinho) e Claudinei (Malcom) por estarem do meu lado nos momentos alegres e tristes.

Aos meus tios de Vitória, Cida e Cléber, e minha prima Nayana pelo carinho.

À Dona Laura, Sirlene, Felipe, Joanna, Ricardo, Rejane, Radimilla e Padre Pedro Fosse pela amizade.

Aos amigos da Secretaria de Pós-graduação.

A todas as pessoas amigas que moram no meu coração....muito obrigado!!!

Ao CNPq e à Fapesp pelo apoio financeiro.

Abreviaturas

DO	Densidade óptica
IPTG	Isopropil β -tiogalactosídeo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-ácido acético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
<i>Xac</i> (306)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>citri</i> , estirpe 306
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>
AI	Auto-indutor
HSL	Homoserina lactona
ATP	Adenosina trifosfato
TBS	Tampão Tris salino

1. RESUMOS.....	9
1.1. RESUMO.....	9
1.2. ABSTRACT.....	10
2. INTRODUÇÃO.....	12
2.1. O CANCRO CÍTRICO.....	12
2.2. PROJETO GENOMA DO XANTHOMONAS AXONOPODIS PV CITRI	14
2.3. O QUORUM-SENSING EM BACTÉRIAS.....	14
2.4. SISTEMAS DE DOIS COMPONENTES EM BACTÉRIA.....	18
2.5. REGULADORES DOS FATORES DE PATOGENICIDADE (Rpf) EM XANTHOMONAS.....	21
A.....	23
2.6. INTERAÇÕES ENVOLVENDO AS PROTEÍNAS RpfC, RpfG e RpfF DE XAC	26
INTERAÇÕES RpfF-RpfC e RpfF-RpfF.....	26
2.7. FUNÇÃO DO DOMÍNIO HD-GYP DA PROTEÍNA RpfG E PROTEÍNAS CONTENDO OS DOMÍNIOS GGDEF E EAL, REGULADORES DA PRODUÇÃO DE C-diGMP.....	29
3. OBJETIVOS.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. CLONAGEM DAS PROTEÍNAS RpfC E SEUS DOMÍNIOS, RpfG, RpfF e CMF EM VETOR DE EXPRESSÃO	38
4.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RpfS e CMF EM E. COLI.....	41
4.3. ENOVELAMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR MEIO DE DIÁLISE	42
TAMPÃO UTILIZADO.....	43
4.4. ENOVELAMENTO DE RpfF e RpfG POR MEIO DE DIÁLISE NA PRESENÇA DE RpfC	43
4.5. PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA RpfC, RpfG e CMF E ENSAIOS DE WESTERN BLOT.....	43
4.6. DICOÍSMO CIRCULAR DE PROTEÍNAS PURIFICADAS	45
4.7. DETECÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS DO SISTEMA Rpf e CMF POR ENSAIOS DE OVERLAY.....	45
4.8. EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RpfCHis173-726 COM O DETERGENTE N-LAUROIL-SARCOSINA (SARCOSIL).....	46
4.9. ENSAIO DE LIGAÇÃO DE RpfCHis173-726 A ATP UTILIZANDO ATP-AGAROSE	46
4.10. ENSAIO DE MODULAÇÃO POR ATP DAS INTERAÇÕES ENTRE A PROTEÍNA RpfCHis173-726 E RpfF, RpfG e CMF EM PLACA DE ELISA.....	46
4.11. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES RpfS e CMF DURANTE O CRESCIMENTO DE XAC POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	47
4.12. OBTENÇÃO DO CLONE pOBD-RpfG-HD-GYP (190-379).....	49

4.13. ENSAIO DE DOIS HÍBRIDOS USANDO DOMÍNIO RpfG-HD-GYP (190-379) COMO ISCA.....	50
4.14. CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CÉLULAS DE Dictyostelium discoideum E ENSAIO DE CRESCIMENTO COM XAC.....	52
4.15. OBTENÇÃO DO NOCAUTE PARA CMF EM XAC.....	54
4.16. TRANSFORMAÇÃO DE XAC (306) POR ELETROPORAÇÃO	54
4.17. CONFIRMAÇÃO DO MUTANTE CMF::KAN POR SOUTHERN BLOT.....	56
4.18. ENSAIOS DE CRESCIMENTO DO MUTANTE CMF::KAN EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	57
4.19. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE DA ESTRUTURA MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS FORMADAS POR CEPAS SELVAGEM E MUTANTE (CMF::KAN).....	58
4.20. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA NAS CEPAS SELVAGEM E MUTANTE CMF::KAN IN VIVO.....	58
4.21. ENSAIO DE PATOGENICIDADE DO MUTANTE CMF::KAN EM PLANTAS DE CITRUS SPP	59
 5. RESULTADOS.....	 60
5.1. CLONAGEM DOS GENES RPFs E CMF EM VETOR DE EXPRESSÃO EM E. COLI.....	60
5.2. PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	61
5.3. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	63
5.4. DIÁLISES: UM ENOVELAMENTO COOPERATIVO ENTRE RpfC/RpfF E RpfC/RpfG.....	64
5.5. TESTE DOS ANTICORPOS PARA RpfC, RpfG E CMF.....	66
5.6. ANÁLISE DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS DO SISTEMA RPF E CMF POR OVERLAY.....	67
5.7. ANÁLISE DE LIGAÇÃO DE RpfCHis173-726 EM MATRIZ DE ATP-AGAROSE.....	69
5.8. ANÁLISE DE MODULAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS DO SISTEMA RPF E CMF POR ATP	70
5.9. O DOMÍNIO HD-GYP DE RpfG INTERAGE COM DOMÍNIOS GGDEF E UM ATIVADOR DE FATOR SIGMA 54 (NtrC) EM ENSAIOS DE DOIS HÍBRIDOS	72
5.10. EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES RpfG, RpfC, RpfF, RpfB, CMF E GUMD DURANTE O CRESCIMENTO DE XAC EM MEIO NA.....	74
5.11. Co-CULTIVO DE Dictyostelium discoideum COM XAC.....	77
5.12. PRODUÇÃO DOS MUTANTES DO NOCAUTE EM CMF DE XAC E ENSAIO DE CRESCIMENTO DAS CEPAS SELVAGEM E MUTANTE NOS MEIOS NA E NYGB.....	79
5.13. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE DA ESTRUTURA MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS FORMADAS POR CEPAS SELVAGEM E MUTANTE PARA CMF EM XAC.....	81
5.14. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA NAS CEPAS SELVAGEM E MUTANTE CMF::EZ-Tn5<KAN-2> IN VIVO.....	83
5.15. ENSAIO DE PATOGENICIDADE DO MUTANTE CMF::EZ-Tn5<KAN-2> EM PLANTAS DE CITRUS SPP	85
 6. DISCUSSÃO.....	 88
INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA ENVOLVENDO O SISTEMA DE DOIS COMPONENTES RpfCG.....	89
6.1. INTERAÇÃO DIRETA ENTRE RpfC E RpfF.....	89
6.2. INTERAÇÃO DIRETA ENTRE RpfC E RpfG	89
6.3. INTERAÇÕES ENTRE O DOMÍNIO HD-GYP DE RpfG COM UM GRUPO DE PROTEÍNAS DE XAC COM DOMÍNIO DE DIGUANILATO CICLASE (GGDEF).....	90

6.4. INTERAÇÕES ENTRE O SISTEMA DE DOIS COMPONENTES RpfCG E O COMPLEXO NtrBC-SIGMA54	93
6.5. INTERAÇÕES ENTRE RpfC E CMF	94
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O PROCESSO DE QUORUM-SENSING EM XAC	96
6.6. OS GENES RPF, COM EXCEÇÃO DE RPF _G , E CMF APRESENTAM UMA EXPRESSÃO DIFERENCIAL E AUMENTADA DURANTE O QUORUM-SENSING EM XAC	96
ESTUDOS EM XAC PARA DEFINIR UMA POSSÍVEL FUNÇÃO PARA CMF	99
6.7. O MUTANTE DE XAC COM O GENE CMF INTERROMPIDO APRESENTA FENÓTIPOS DIFERENCIADOS DA CEPA SELVAGEM	99
 7. CONCLUSÕES	 108
 8. BIBLIOGRAFIA	 110
 9. ANEXOS	 123

Resumo

1. Resumos

1.1. Resumo

Parte da produção de fatores de virulência em bactérias do gênero *Xanthomonas* esta sob controle de um grupo de genes localizados no locus *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*), que respondem ao aumento da densidade celular num processo chamado *quorum sensing*. Os genes que codificam as proteínas do sistema Rpf de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*) foram clonados no vetor pOBD por Alegria (2004), e usados como iscas em ensaios de dois híbridos, contra uma biblioteca de *Xac* clonada no vetor pOAD. Neste ensaio, foram observadas interações entre RpfC-RpfG, RpfC-RpfF, RpfF-RpfF e RpfC-CMF. O gene *cmf* tem um ortólogo, cuja função esta relacionada com o processo de *quorum sensing* em *Dictyostelium*. Para confirmar essas interações, RpfC e seus domínios, RpfG, RpfF e CMF foram expressas e purificadas, produzidos anticorpos, e foram efetuados ensaios de ligação *in vitro*. Em adição, o domínio HD-GYP de RpfG, que apresenta atividade de fosfodiesterase, também foi usado como isca no ensaio de dois híbridos. Interessantemente, a maioria de suas presas foi derivada de domínios GGDEF (diguanilato ciclase) de um grupo de proteínas de *Xac*. Em bactérias, muitos fenótipos, como a ativação da virulência, a formação de biofilme e a mobilidade, são controlados pelo processo de *quorum sensing* e por diGMP cíclico. Neste trabalho demonstramos uma ligação direta entre *quorum sensing* e diGMP cíclico, representada pela interação entre HD-GYP/GGDEF. Finalmente, estudos com um mutante para o gene *cmf* interrompido, envolvendo formação de biofilme, produção de goma xantana e patogenicidade, evidenciam que CMF tem uma função relevante no processo de *quorum sensing* em *Xanthomonas*.

1.2. Abstract

In *Xanthomonas* a group of genes named regulators of the pathogenicity factors (*rpf*) control the synthesis of virulence factors as a function of cellular density in a process termed quorum sensing. Alegria (2002) cloned the *rpf* genes from *Xanthomonas axonopodis* pv citri (*Xac*) in the pOBD vector and used them as baits in two hybrid assays against a *Xac* prey library cloned in the pOAD vector and showed that RpfC interacts with RpfG, RpfF and CMF. Homologous of the *cmf* gene are found only in amoebas such as *Dictyostelium*, where plays a central function in the *quorum sensing* process. In this work, we expressed and purified RpfC and its domains, RpfG, RpfF and CMF and raised antibodies against these polypeptides. In vitro assays demonstrated the following interactions: RpfC-RpfF, RpfC-RpfG and RpfC-CMF. We show that RpfG and CMF interact with the response regulator domain of RpfC, and interactions RpfG and CMF also interact with the histidine phosphotransfer domain of RpfC. In addition, the recently characterized HD-GYP phosphodiesterase domain of RpfG was used as bait in the two hybrid assays. Interestingly, the majority of its preys were derived from a set of *Xac* proteins that possess GGDEF domains (diguanylate cyclase). In bacteria, many complex processes such virulence, motility and biofilm production are controlled by quorum sensing process and by levels of the second messenger cyclic diGMP. Our results demonstrate a direct link between quorum sensing and diGMP cyclic signaling pathways in the form of a direct physical interaction between the RpfG HD-GYP domain and GGDEF domains. Finally, studies with a *Xac cmf*⁻ mutant show that CMF plays an important role in the quorum sensing process in *Xanthomonas*, including biofilm production, synthesis of xanthan gum and pathogenicity.

Introdução

2. Introdução

2.1. O cancro cítrico

A interação hospedeiro-patógeno aos olhos da biologia evolutiva tem sido tratada como uma guerra com o surgimento de estratégias inovadoras para ambos os lados, garantindo, dessa forma, a sobrevivência tanto do hospedeiro quanto do patógeno. Van Valen (1973) referiu a esse conceito da necessidade contínua de mudança do genoma do organismo, como "hipótese da Rainha vermelha". A Rainha Vermelha é uma referência a personagem Rainha Vermelha da obra "*Alice Through the Looking Glass*" escrita por Lewis Carroll, 1960, quem disse a Alice a seguinte frase: "aqui (nesta terra) você pode correr o quanto que você agüentar, mas você não sairá do mesmo lugar" (Ridley, 1993). Desse modo, as espécies de hospedeiros e seus respectivos patógenos co-evoluem de forma aumentando a sua interdependência (Dawkins e Krebs, 1979). Bactérias patogênicas de plantas são, geralmente, específicas como, por exemplo, *Ralstonia solanacearum* que infecta solanácea e *Pseudomonas syringae* pv *passiflorae* maracujás (*Passiflora* spp). Nas plantas hospedeiras elas se multiplicam e, após um período definido de tempo, produzem sintomas da infecção que são típicos para cada espécie de bactéria (Chan *et al.*, 1999). *Xanthomonas* é um gênero de fitopatógeno bacteriano responsável por doenças em algumas variedades de hospedeiros, incluindo citros, arroz, uva, feijão e algodão (Swings *et al.*, 1993). O *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*), causadora do cancro cítrico, invade seu hospedeiro (*Citrus* spp) através dos estômatos e lenticelas. Desse modo, todos os tecidos aéreos como ramos, folhas e frutos são susceptíveis ao ataque (Figura 1). As lesões causadas por essa bactéria resultam em queda de frutos, folhas e, conseqüentemente, da produção (Brunings e Gabriel, 2003). Embora o cancro cítrico seja responsável por perdas econômicas significativas na produção de frutas cítricas, pouco se conhece sobre os mecanismos de patogenicidade e virulência do agente causador.

Figura 1. Citros mostrando sintomas do cancro cítrico. A) Folhas e frutos infectados em estágio avançado da doença (Fundecitrus: cienciahoje.uol.com.br). B) Folha com lesões ocasionadas pelo *Xac* (www.socitrus.com.br).

2.2. Projeto genoma do *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

O genoma de 5.1 Mb do *Xac* foi totalmente seqüenciado e anotado por um consórcio de laboratórios do Estado de São Paulo (da Silva *et al.*, 2002 - <http://genoma4.iq.usp.br>). A anotação identificou pouco mais de 4300 genes ou genes putativos (ORFs = “open reading frames”), sendo que boa parte deles (60%) puderam ser identificados com base em suas homologias com genes depositados nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information-www.ncbi.nlm.nih.gov). As ORFs restantes (40%) são homólogas a seqüências que codificam proteínas com funções desconhecidas ou não apresentam identidade com as seqüências depositadas no NCBI.

2.3. O *quorum-sensing* em bactérias

O processo de *quorum-sensing* em bactéria consiste de um mecanismo de sinalização química que altera a expressão gênica e ativa um comportamento cooperativo entre bactérias da mesma espécie em condições de alta densidade celular (Whitehead *et al.*,

2001; Waters e Bassler, 2005; Baysse *et al.*, 2005). Muitas funções adaptativas são ativadas por esse processo em bactérias, como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1. Processos adaptativos ativados durante o *quorum-sensing* em bactérias.

Função ativada pelo <i>Quorum-sensing</i>	Bactéria	Referência
Bioluminescência	<i>Vibrio fischeri</i>	Boettcher et al., 1990
	<i>Vibrio harvey</i>	Bassler et al., 1994
Esporulação	<i>Bacillus subtilis</i>	Solomon et al., 1995
Conjugação	<i>Bacillus subtilis</i>	Solomon et al., 1995
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Piper et al., 1999
Produção de antibióticos	<i>Erwinia caratovora</i> pv <i>caratovora</i>	Bainton et al., 1992
Biofilme	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glessner et al., 1999
Dispersão	<i>Xanthomonas campestris</i> pv	Dow et al., 2003
	<i>campestris</i>	
Virulência	<i>Xanthomonas campestris</i> pv	Slater et al., 2000
	<i>campestris</i>	
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Flavier et al., 1997
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Nasser et al., 1998

A comunicação intercelular que ocorre durante o QS se faz através de pequenas moléculas sinalizadoras que são chamadas de auto-indutores. Vários auto-indutores têm sido identificados em bactérias; entre eles destacam-se as acil-homoserinalactonas (HSL) produzidas pelas bactérias Gram-negativas e peptídeos cíclicos produzidos pelas Gram-positivas. Recentemente identificou-se ácidos graxos com até 16 carbonos que funcionam como auto-indutor em algumas bactérias Gram-negativas incluindo *Xanthomonas* e *Ralstonia* (Lian-Hui Zhang *et al.*, 2004) (Tabela 2)

Tabela 2. Estruturas químicas e funções de auto-indutores (AI) – moléculas sinalizadores do processo de *quorum-sensing* (Lian-Hui Zhang *et al.*, 2004).

Signal and structure	Representative organism	Function regulated
N-acyl homoserine lactone(AHL)	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Bioluminescence Plasmid transfer Virulence and antibiotics Virulence and biofilm Virulence
Furanosylborate (AI-2)	<i>Vibrio harveyi</i>	Virulence
Cyclic thiolactone (AIP-II)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Virulence
Hydroxy-palmitic acid methyl ester (PAME)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Virulence
Methyl dodecenoic acid (DSF)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Virulence
Farnesic acid	<i>Candida albicans</i>	Dimorphic transition and virulence

Os auto-indutores mais bem estudados pertencem ao grupo das acil-homoserina lactonas (HSL) característicos das bactérias Gram-negativas. A primeira HSL conhecida foi estudada em *Vibrio fischeri*, uma bactéria que coloniza o órgão produtor de bioluminescência da lula *Euprymna scolopes* (Visick *et al.*, 2000; Bassler e Waters, 2005). O processo de *quorum-sensing* em *V. fischeri* ativa a produção de bioluminescência que protege a lula contra predadores. Esse tipo de associação entre lula e *V. fischeri* pode ser definida como uma relação simbiótica onde a lula fornece alimento para bactéria, e a bactéria proteção para lula (Visick *et al.*, 2000).

A HSL em *V. fischeri* é produzida pela enzima denominada LuxI. A natureza hidrofóbica dessa molécula a permite atravessar a membrana plasmática bacteriana por difusão, e desse modo, acumular-se no meio extracelular. Em condições de alta densidade celular esse auto-indutor liga-se a proteína regulatória LuxR, que apresenta um domínio de

ligação ao DNA tipo HTH (*helix-turn-helix*). Desse modo LuxR atinge uma conformação apropriada para ligar-se a sítios específicos no cromossomo de *V. fischeri* ativando a expressão do operon *luxICDABE* responsável por codificar a enzima LuxI (“feedback” positivo) e polipeptídeos envolvidos na produção de bioluminescência nessa bactéria, e também regular negativamente a expressão do gene *luxR* (Figura 2) (Dunlap e Greenberg, 1988). Ortólogos do sistema *luxI/luxR* são amplamente distribuídos entre as bactérias Gram-negativas (Miller e Bassler, 2001).

Figura 2. Representação do processo de *quorum-sensing* em *V. fischeri* (Dunlap e Greenberg, 1988). LuxI é a proteína responsável pela produção do auto-indutor, e LuxR é a proteína necessária para detectar e responder ao auto-indutor. Após ser sintetizado por LuxI, o auto-indutor (pentágono azul) acumula no meio, principalmente em condições de alta densidade celular, favorecendo, dessa forma, sua interação com LuxR. O complexo LuxR/auto-indutor é o ativador transcricional do operon *luxICDABE*. A ativação de *luxICDABE* estabelece um feedback positivo, aumentando a produção do auto-indutor por LuxI e a quantidade de luz emitida pela bactéria (via *luxCDABE*). De mesmo modo, o complexo LuxR/auto-indutor inibe a transcrição de *luxR*. A forma oval representa a

bactéria; o quadrado e o círculo, as proteínas LuxI e LuxR, respectivamente; pentágono azul, o auto-indutor.

Os mecanismos de percepção das moléculas auto-indutoras podem envolver também sistemas de transdução de sinal tipo dois componentes, que são formados por uma proteína transmembrana que capta o sinal e o transfere (através de reações de transfosforilação) para outras proteínas, promovendo a alteração da expressão gênica na célula bacteriana.

2.4. Sistemas de dois componentes em bactéria

As vias de sinalização envolvendo sistemas de dois componentes em bactéria são formadas por histidinas cinases (HK) e seus respectivos substratos denominados reguladores de respostas (RR) (Figura 3). Os RR apresentam um resíduo de aspartato conservado no domínio regulador (Fig. 3) que é muitas vezes fusionado a um domínio efetor (Fig. 3) que pode ser um domínio de ligação ao DNA ou uma enzima. O estado de fosforilação do domínio RR controla a atividade do domínio efetor. As histidinas cinases normalmente são proteínas híbridas apresentando adicionalmente um ou mais domínios sensores que captam sinais do meio que estimulam ou inibem a sua autofosforilação. Essas cinases podem também apresentar um domínio regulador de resposta (RR) e histidina fosfotransferase (Hpt) fusionados que recebem e transferem o grupo fosfato. Esses múltiplos passos de transfosforilação são os principais componentes que controlam o comportamento bacteriano, modificando a fisiologia celular através de interações proteína-proteína, e o programa de expressão gênico em resposta a sinais extracelulares (Appleby *et al*, 1996; Ulrich, *et al*, 2005; Skerker *et al*, 2005).

A Figura 3 representa um exemplo de um sistema de dois componentes típico. O domínio de histidina cinase em resposta a um estímulo ou sinal externo se autofosforila promovendo a ligação do grupo fosfato no resíduo de histidina conservado. Sequencialmente o grupo fosfato é transferido para um resíduo de aspartato conservado no seu domínio RR. A fosforilação do RR conduz mudanças na fisiologia da célula devido à ativação do seu domínio Efetor (Klumpp e Krieglstein, 2002).

Figura 3. Modelo de um sistema de dois componentes. Um sinal externo controla a autofosforilação da Histidina cinase (HK), e conseqüentemente a ativação dos domínios Reguladora de resposta (RR) e Histidina fosfotransferase (Hpt) dessa proteína híbrida, que em seguida transfere o fosfato para o domínio RR da proteína com um segundo domínio efetor. Os fosfatos são representados por P, e as setas indicam os possíveis caminhos de transfosforilação (Kwon *et al.*, 2000). Notar que, proteínas de outros sistemas de dois componentes podem ter arquiteturas variadas, com os domínios HK, RR, Hpt e efetor em polipeptídeos individuais ou em outras combinações.

A finalização dos projetos genomas de muitos procariotos e o depósito dessas seqüências em bancos de dados permitiram realizar análises comparativas entre esses genomas que mostraram que as proteínas histidinas cinases e “metyl-accepting chemotaxis” (MCPs), proteínas relacionadas com o processo de quimiotaxia, não são os únicos tipos de receptores moleculares presentes em bactérias. A arquitetura característica de receptores, a qual inclui um domínio sensor, um ou mais segmentos transmembrana, e um domínio efetor citoplasmático, foi predita para muitas proteínas codificadas pelos genomas seqüenciados. Contudo, seus domínios efetores C-terminais não são histidinas cinases ou MCPs, mas Adenilatos ciclases, Serina/Treonina cinases, diguanilato ciclases, ou fosfodiesterases (Galperin e Gomelsky, 2005) (Fig. 4). A identificação dos sinais de ativação para esses domínios efetores e seus respectivos alvos intracelulares é um dos grandes desafios atuais para entender como esses sistemas controlam o metabolismo

bacteriano, ativando ou inibindo a expressão de genes relacionados com a adaptação ao ambiente ou virulência nesses organismos.

Figura 4. Mecanismos principais de transdução de sinal de vários receptores transmembrana em bactérias. Histidinas cinases transferem um grupo fosfato para domínios Reguladores de resposta (CheY), os quais tipicamente regulam a transcrição. Adenilato ciclases aumentam o nível celular de cAMP, o qual, em complexo com proteínas com domínio CAP (“Catabolite activator protein”), estimula a transcrição de inúmeros genes com promotores fracos. Proteínas Ser/Thr cinases fosforilam vários alvos, incluindo fatores de transcrição. Diguanilato ciclases, que possuem o domínio GGDEF, produzem c-diGMP, um segundo mensageiro bacteriano identificado recentemente, o qual interage com alvos desconhecidos regulando a formação de biofilme, mobilidade, desenvolvimento, virulência, expressão gênica e outras funções celulares. Proteínas MCPs (“Methyl-accepting chemotaxis”) transmitem seus sinais para o motor flagelar através de uma complexa cascata de interações entre proteínas CheABRYZW, e também podem controlar a expressão de genes relacionados com desenvolvimento (Galperin e Gomelsky, 2005).

2.5. Reguladores dos Fatores de Patogenicidade (Rpf) em *Xanthomonas*

A síntese de enzimas extracelulares (incluindo proteases, pectinases e endoglucanases) e exopolissacarídeos importantes no processo de infecção ocasionado por *Xanthomonas spp* estão sob o controle e regulação de um grupo de genes denominados *rpf* (“regulation of pathogenicity factors”) (Figura 5). Foi visto que em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*) a expressão dos genes *rpf* é constitutiva e aumentada quando crescida em meio líquido na fase estacionária ou durante o processo infeccioso, indicando que estas proteínas estejam relacionadas com o processo de colonização do hospedeiro e com adaptação a alterações ambientais (Slater *et al.*, 2000). Em *Xcc*, o locus *rpf* é constituído por nove genes denominados de *rpfA-I*. Em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*) o locus *rpf* perdeu os genes *rpfH* e *rpfI*, sendo portanto constituído por sete genes (*rpfA-rpfG*). Os principais componentes são denominados *rpfB*(XAC1880), *rpfF*(XAC1879), *rpfC*(XAC1878) e *rpfG*(XAC1877) (Figura 5).

Figura 5. Mapa físico e organização transcripcional do locus *rpf* de *Xac* e *Xcc*. A direção das setas está indicando o processo de transcrição das ORFs, as quais estão nomeadas abaixo (<http://genoma4.iq.usp.br>). As setas pretas representam os genes *rpf*s. t t, transposases XAC1871 e XAC1872.

Em alguns casos, a análise de mutantes possibilitou atribuir possíveis funções a estes grupos de genes. RpfC codifica uma proteína híbrida com domínios transmembrana,

Histidina Cinase (HK), Regulador de Resposta (RR) e Histidina fosfotransferase (Hpt) (Figura 6); RpfG é uma proteína que apresenta um domínio RR e um domínio conservado em bactérias HD-GYP que atua como fosfodiesterase (Ryan *et al.*, 2006). RpfC e RpfG funcionam como um sistema de dois componentes controlando a expressão de proteases, endoglucanases e genes relacionados com biossíntese de goma xantana. Esse controle é dependente da concentração da molécula sinalizadora DSF (*diffusible signal factors*) no meio, e outros fatores ainda não conhecidos que em conjunto regulam RpfC e RpfG. RpfF, uma enoil-CoA hidratase, e RpfB, uma acil-CoA ligase, são enzimas envolvidas na síntese do fator DSF derivado de ácido graxo (Slater *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). A identidade química do DSF de *Xcc* é ácido Cis-9-metildodecenóico (Wang *et al.*, 2004), sendo muito similar a molécula sinalizadora, ácido β -metil-palmitico, de *quorum-sensing* em *Ralstonia solanacearum* e *Cândida albicans* (Zhang *et al.*, 2004)

. Mutantes em *rpfF* e *rpfB* são incapazes de sintetizar DSF. Contudo, mutantes em *rpfF* podem secretar enzimas e polissacarídeos da mesma forma que a cepa selvagem quando DSF é adicionado ao meio de cultura (Barber *et al.*, 1997; Slater *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004).

He *et al.* (2005), através de análises de microarranjos de DNA, identificaram os genes de *Xcc* que têm sua expressão alterada em presença e ausência de DSF. O conjunto desses genes que mostraram uma expressão diferencial, portanto regulados por DSF, foi chamado de DSF-regulon. Entre eles observou-se um aumento de expressão dos genes que codificam para enzimas secretadas e enzimas envolvidas na biossíntese de goma xantana, confirmando outros dados na literatura (Slater *et al.*, 2000; Dow *et al.*, 2003), e ainda dos genes que codificam fatores envolvidos na síntese de flagelo e resistência a estresses oxidativos que, em outros patógenos, têm grande importância durante o processo de colonização do hospedeiro (Walters e Sperandio, 2006; Whiteley *et al.*, 2001; Whitehead *et al.*, 2001; Schell, 2000). Outro resultado importante foi com relação ao DSF inibir a expressão dos genes que codificam o sistema de secreção tipo III (T3SS), que já foi demonstrado contribuir para o desenvolvimento da patogênese atuando na injeção de fatores primários de virulência na célula do hospedeiro. Esses resultados a princípio lembram os mecanismos de virulência do fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* onde o processo de *quorum-sensing* e produção de fatores de virulência do T3SS, que é

primariamente ativado durante a colonização do hospedeiro, são regulados de forma contrária (Genin *et al.*, 2005). Na fase tardia de colonização do hospedeiro, o regulador de resposta PhcA é ativado e inibe a ação de outro regulador de resposta (HrpG), que atua como ativador de transcrição dos fatores primários de virulência (T3SS) codificados pelo *locus hrp*. De modo oposto, esse mesmo fator PhcA ativa a produção de biofilme durante o *quorum-sensing* (Genin *et al.*, 2005).

Adicionalmente, ao DSF, outra molécula sinalizadora chamada DF (*Density Factor*) caracterizada como uma γ -butirolactona também regula a síntese de goma xantana, e primariamente pigmentos chamados xantomonadinas que conferem proteção em *Xanthomonas spp* (Poplawsky *et al.*, 2005).

Figura 6. Na parte **A** está esquematizado os domínios da proteína RpfC, e **B** mostra a sequência completa de aminoácidos de RpfC com seus domínios Histidina Cinase (HK),

Regulador de resposta (RR) e Histidina fosfotransferase (Hpt) coloridos em vermelho, azul e verde, respectivamente. H200, N, G1, F, G2, D466 e H656 são resíduos conservados nos domínios de RpfC e seus ortólogos; P representa o grupo fosfato.

No modelo proposto para o funcionamento da via de transdução de sinal ativada pelo *quorum-sensing* em *Xanthomonas* (Slater *et al.*, 2000), o aumento da concentração de DSF no meio, devido à alta densidade celular, facilita sua ligação no domínio sensor de RpfC. Desse modo, a autofosforilação de RpfC no domínio histidina cinase é ativada, e o grupo γ -fosfato do ATP é transferido ao resíduo de histidina (His₂₀₀) conservado nesse domínio. A seguir o fosfato é transferido para os domínios RR (Asp₄₆₆) e Hpt (His₆₅₆) respectivamente, chegando até o domínio receptor de RpfG, que apresenta um resíduo de aspartato conservado na posição 34. RpfG é ativada e seu grupo efetor HD-GYP deve atuar diminuindo a concentração de c-di-GMP na célula (Galperin, 2004; Ryan *et al.*, 2006). Essa mudança de concentração de c-di-GMP pode ser fundamental para ativação da síntese de goma xantana e fatores de virulência (Slater *et al.*, 2000; Crossman e Dow, 2004) (Figura 7).

Alta densidade celular

Figura 7. Modelo funcional para RpfC, G e F na regulação de DSF e produção dos fatores de patogenicidade em *Xcc* proposta por Slater et al. (2000). A percepção de sinais do meio ocorre através da ligação de moléculas no domínio sensor de RpfC; Isso estimula a autofosforilação do seu domínio cinase. Esses fatores ambientais podem ser o próprio DSF. Autofosforilação de RpfC ativa uma cascata de fosforilação até o domínio Regulador de Resposta em RpfG. A fosforilação pode ocorrer no sentido His-Asp-His-Asp ou diretamente do domínio de transferência de RpfC para RpfG. O grupo fosforil é indicado como P. A forma fosforilada de RpfG regula positivamente a expressão de genes requeridos na infecção, incluindo aqueles que codificam endoglucanase (*engXCA*), protease (*prtA*) e “cluster” gum que codifica enzimas envolvidas na síntese do polissacarídeo xantana. O mecanismo pelo qual RpfG regula efeitos desses genes ainda é pouco conhecido, mas possivelmente um regulador intracelular semelhante ao diguanilato cíclico (c-di-GMP)

parece ser requerido nesse processo. RpfC regula negativamente *rpfF*, a qual está envolvida na síntese de DSF, por um mecanismo independente de *rpfG*.

2.6. Interações envolvendo as proteínas RpfC, RpfG e RpfF de *Xac*

Experimentos realizados em nosso laboratório usando o sistema dois híbridos mostraram algumas importantes interações entre membros do “cluster” *rpf* inéditas na literatura (Alegria, 2004; Andrade *et al.*, 2006).

Interações RpfF-RpfC e RpfF-RpfF

Quando RpfF foi usado como “isca” em ensaios de dois híbridos contra uma biblioteca genômica de *Xac*, noventa e sete por cento das presas identificadas eram derivadas de RpfC. Isso, por si só, mostra uma ligação extremamente específica entre esses dois polipeptídeos. O domínio mínimo encontrado para essa interação em RpfC compreende a região entre os aminoácidos 442-675, região esta que contém o domínio regulador de resposta (RR) compreendido entre os aminoácidos 460-583 de 726 totais (Figura 2).

Uma outra interação foi observada envolvendo presas derivadas da própria RpfF. Apesar de ter sido encontrada apenas duas vezes, esta interação pode ter sido “mascarada” devido ao grande número de interações observadas com RpfC. Nas duas vezes em que RpfF foi detectada como presa, o segmento de DNA codificava a proteína a partir do aminoácido 14 (Andrade *et al.*, 2006).

Interações RpfC-RpfG

RpfC (XAC1878) contém uma porção N-terminal associada à membrana interna o que nos levou a usar no ensaio duplo-híbrido apenas a porção citoplasmática dessa proteína, compreendida entre os aminoácidos 170-726. Como tinha sido observado anteriormente, RpfC mostrou uma grande afinidade por RpfF (XAC1879) (28/55 = 51% das interações observadas). Além disso, seis das presas (11%) mapearam a RpfG (ORF 2371). Este resultado foi predito pelo modelo de Slater *et al.* (2000), mas nunca antes confirmado experimentalmente.

Interações de RpfC com CMF, um homólogo bacteriano de um fator de quorum- sensing de Dictyostelium discoideum

Cinco presas de RpfC foram derivadas da ORF XAC0330. Este gene codifica uma proteína denominada CMF (“Conditioned Medium Factor”) que está presente apenas em *Xanthomonas spp*, exceto *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Lee *et al.*, 2005), quando analisados os genomas procariotos sequenciados. Essa proteína, XAC0330, possui grande similaridade com a proteína de mesmo nome encontrada em *Dictyostelium discoideum* (Figura 8).

Dictyostelium normalmente vive na forma unicelular amebóide sobre a superfície do solo se alimentando de bactérias e leveduras (Eichinger *et al.*, 2005). Eles proliferam por fissão em condições com disponibilidade de recursos alimentares (Deery *et al.*, 2002). Quando os recursos alimentares estão esgotados suas células começam a produzir e secretar uma glicoproteína de 80 KDa chamada CMF (“Conditioned Medium Factor”). O aumento da concentração de CMF no meio promove a liberação de “pulsos” de cAMP que funciona como quimioatrativo, induzindo a agregação celular, e conseqüentemente a formação de um corpo de frutificação com esporos. A alta concentração de CMF no meio é requerida para ativação dos “pulsos” de cAMP e influxo de Ca^{2+} na célula (Deery *et al.*, 2002).

```

CmfA_Xac      MPKPSLSLSLLCSLSLLSAPLAAALQPKQLAGPPEEFAQMRAPDPAESAILSKSALL 60
CmfA_Xcv      MPKP--SPLSLLCSLSLLCAPLAAALQPKQLAGPPEEFAQMRAPDPAESAILSKSALL 57
CmfA_Xcc      MHTP---SLLSLSLCSLSLIAAPLGAALQPKQLAGPPEEFAQMRAPDPAESAILSKSALL 57
CmfA_Dicty    -----MRLLLLLLILITINFSGVLTPKNLAGEASEFGSFNIPNMDVAQSSDSSLF 52
CmfA_Dicty2   -----

CmfA_Xac      PVELAP--AGQSAWQGS LPEVNG-HLRFMVLSGDAQWDAVAALQLAGARATAVAT--- 114
CmfA_Xcv      PVELAP--AGQSAWQGS LPEVNG-HLRFMVLSGDAQWEAAVAAPQLAGARATAAVAT--- 111
CmfA_Xcc      PVELAP--AGASARWQGS LPEVNG-HLRFMVLGDAQWDAVAAPRVAGAR-AAAP--- 110
CmfA_Dicty    GISMTQSQLKNSFEWGSVVPVDSSEEFTLTFSSFPLESEFKVEASPKTSLSSKSESEHK 112
CmfA_Dicty2   -----

CmfA_Xac      -----PLHAQRTLLGTAEHGTSGMRYAVESARNGAWSLTQLQSSSPVAQRG-YV 161
CmfA_Xcv      -----PLQAQRTLLGSAEHGTSGMRYAVDSARNGAWALTQLQSSSPVAQRG-YV 158
CmfA_Xcc      -----QLQAQRTLGSADSGTSGMRYAVDAAQNGVWSLTQLQASPTAQRG-YV 157
CmfA_Dicty    SKFYKVIKISYQTPVTNGSFGIDGATTPSFSLTWDPKPVVDWNVVITASSSLRKNKFKQ 172
CmfA_Dicty2   -----MGSFGIDGATTPSFSLTWDPKPVVDWNVVITATSSLRKNKFKQ 43
                        : *      * . : : . * * : : : * . : : :

CmfA_Xac      LMEGDARTQLASYLR--TRQQQVQGS LTLNALLSGNDARGATLLTAQAGTIDQASLRVID 219
CmfA_Xcv      LMEGDARTQLASYLR--TRQQQVQGS LTLNALLSGNDVRGATLLTAQAGTIDEASLRVID 216
CmfA_Xcc      LMEGDPRTQLASYPR--HRHQVQGS LTLNALLSGSDAQAGLLAGAQIDQASLRVID 215
CmfA_Dicty    KMVEDSTPQLMLVQNPSDTHIYSYSSYNLFTGQKVSVLAMLHKKSEFIKKSSANRPL 232
CmfA_Dicty2   KMVEDSTPQLMLVQNPSDTHIYSYSSYNLFTGQKVSVLAMLHKKSEFIKKSSANRPL 103
                        * * . ** : : . : * * : : * : : * .

CmfA_Xac      -----PQGGVRS LPMADDGKHGDGAAGDGVYGGTFQPTSEGTWIA 259
CmfA_Xcv      -----PQGGVRSMPMADDGKHDDGAAGDGVYGGTFQPTSEGTWIA 256
CmfA_Xcc      -----PQGTARTFAMADDGKHDDGAAGDGVYGGTFQPTSEGTWIA 255
CmfA_Dicty    NWKPSPIILSDVSAEMTLGLPDGS ETIPMFDDGLHDDQANDGLFGGYINVS ELGNVDI 292
CmfA_Dicty2   NWKPSPIILSDVSAEMTLGLPDGS ETIPMFDDGLHDDQANDGLFGGYINVS ELGNHDI 163
                        * : * . : : * * * * * * * : : : : : * :

CmfA_Xac      QVIVHGHDAQGQPFVRTSEHVVPVVDTSRLLLGNALGARAAG--TQLTIALPVAARGNA 317
CmfA_Xcv      QVVVHGHDAQGQPFVRTSEHVVPVVDTSRLLLGNALGARAAG--TRLTIALPVAARGNA 314
CmfA_Xcc      QVIVHGRDAQGQPFVRTSEHVLPVLDTSVRLGNALGARAAG--TRLSIGLPVAARGNA 313
CmfA_Dicty    QVVYVYG-SQNGNGVIFSNQHLIPITSQYLELTGEVQSVQDGDANLNIYFIVNSPNQTTVD 351
CmfA_Dicty2   QVVYVYG-SQNGNGVIFSNQHLIPITSQYLELTGEVQSVQDGDANLNIYFIVNSPNQTTVD 222
                        * : : * * : : : : : : : : : * * * . . . . . *

CmfA_Xac      PSHYRVFGQVWGTDAGKGDVPVAWIAGMLTPQQGQ-----LHLSLDERWIARAGARAP 370
CmfA_Xcv      PSHYRVFGQVWGTDAGKGDIPVAWIGMLTPQQGQ-----LPLSLDERWIARAGARAP 367
CmfA_Xcc      PTHYRVFGQVWGTDAGKQIPVAWIGMLTPQQGQ-----LPLSLDERWIARAGARAP 366
CmfA_Dicty    QTPVHVYSEVYGTDDDGGKVAIAWVAGVTSAQPIQGSTTFALS AVLNERWIAKVATAP 411
CmfA_Dicty2   QTPVHVYSEVYGTDDDGGKVAIAWVAGVTSAQPIQGSTTFALS AVLNERWIAKVATAP 282
                        : : : : * * * * * * : : * * : : * * * * * : : * * *

CmfA_Xac      FTLRSLRIEDPDHYIPLVQAGALPL-----QVPALRRASLAHASTAIDESMRMGPRPTAL 425
CmfA_Xcv      FTLRSLRIEDPDHYIPLVQAATLPL-----QVPALRRASISRASTAIDESMRMGPRPTAL 422
CmfA_Xcc      FTLRGLRIEDPDHYIPLAQATLPLPLQL-QLPALRRASIRATAGIDESMRMGPRPTAL 425
CmfA_Dicty    FFVKNVQVSDLDTFIPLSNTTSTSNVKMVG EYKDVRTIVHS PPLHEITKEMRDGKMPKEL 471
CmfA_Dicty2   FFVKNVQVSDLDTFIPLSNTTSTSNVKMVG EYKDVRTIVHS PPLHEITKEMRDGKMPKEL 342
                        * : : : : * * : * * : : : : : : : : : * : : * : * * *

CmfA_Xac      ASAMATAQ-PQAAGSQLVLVHGYCSNGVWPQAQFTNASTFLDAKQNRNSNDQFAQRLAQFA 484
CmfA_Xcv      ASAMAMAQQPQAAGSQLVLVHGYCSNGVWPQAQFTNASTFLDAKQNRNSNDQFAQRLAQFA 482
CmfA_Xcc      ATASALAQ-PQAAGSRVLVHGYCSNGVWPEAQFSNASSFIDAKQNRNSNDQFAQRLAQFA 484
CmfA_Dicty    ADRIKST---GNGKLILTHGYCSEGVWPIEDFENSVEFQDFNQNRGNDEFAQILANFG 527
CmfA_Dicty2   ADRIKST---GNGKLILTHGYCSEGVWPIEDFENSVEFQDFNQNRGNDEFAQILANFG 398
                        * . : . . . : * : * * * * * : * : * * : * * * * * : * :

CmfA_Xac      SQWSS-FSTVAHSQGGMAALHLYTYWWSGLDN--ATGGRVMQSVGTPYQGTNLSGVLA 541
CmfA_Xcv      SQWSS-FSTVAHSQGGMAALHLYTYWWSGLDN--ATGGRVMQSVGTPYQGTNLSGVLA 539
CmfA_Xcc      SQWSS-FATVAHSQGGMAALHLYTYWWSGLDN--ATGGRVMQSVGTPYQGTNLSGILA 541
CmfA_Dicty    SQYTDGFSLVASHQGGMAALHLVTFYFSGLDLSQKLEGRVIQSMGTPYQGTALAGTWASI 587
CmfA_Dicty2   SQYTDGFHLLILIVKVVNAALHLVTFYFSGLDLSQKLEGRVIQSMGTPYQGTALAGTWASI 458
                        * : : . * : : : : : : * * * * * : * : * * * * * * * * * : :

CmfA_Xac      -SWFVGCGTNSDMTYDGAKAWLAGIPADARAKVNYTTTSFAKTNWTNDYCNAASDLVL 600
CmfA_Xcv      GSWFVGCGTNSDMTYDGAKAWLAGIPADARAKVNYTTTSFAKTNWTNDYCNAASDLVL 599
CmfA_Xcc      GSWFVGCGSNTDLTYDGAKAWLAGIPADARAKVNYTTTSFAKTNWTNDYCNAASDLVL 601
CmfA_Dicty    GSAVGVCANDDLTVDGAALWLKSIADKRALVYTTTQYSTGSLIN--YCNLASNAVL 645
CmfA_Dicty2   GSAVGVCANDDLTVDGAALWLKSIADKRALVYLTSTQYSTGSLIN--YCNLASNADL 516
                        * . * * * : * * * * * * . * * * * * * * : : . . * * * : *

CmfA_Xac      NDPEDGTVEQVNAQLP-GGVNRGHTTGQCHTTGMRDPAQYLDANRNAVMNANAAR 654
CmfA_Xcv      NDPEDGTVEQVNAQLP-GGVNRGHTTGQCHTTGMRDPAQYLDANRNAVMNANAAR 653
CmfA_Xcc      NDPEDGTVEQANAQLP-GGVNRGHTTGQCHTTGMRDPAQYLDASRNAVMNANAAR 655
CmfA_Dicty    EWPNDGVVDNE-HTPLEGGVYLNFKDWCSDGMHSPQQTNTTEYNKEMSSNSVW 699
CmfA_Dicty2   RMAEEMVLWIIIGHTPLEGGVYLNFKDWCSDGMHSPQQTNTTEYNKEMSSNSVC 571
                        : : : . : : : * * * * . : . * * : * * : * * : : . * * : * :

```

Figura 8. Alinhamento da proteína CmfA encontrada em *D. discoideum* juntamente com as proteínas CmfA de *Xanthomonas*. Um possível peptídeo sinal, na proteína CMF de *Xac*, está sublinhado e em negrito, indicando que ela pode ser secretada ou estar associada a membrana. A porção da proteína CMF de *D. discoideum*, que mostrou atuar de forma ativa, como a proteína inteira, no processo de agregação, está sombreado e sublinhado (Deery *et al.*, 2002). (*)-resíduos idênticos; (:) -resíduos altamente conservados; (.)-resíduos conservados. *Xac*, *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* ([AAM35222](#)); *Xcv*, *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* ([CAJ21970](#)); *Xcc*, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* ([AAM39632](#)); Dicty, *Dictyostelium discoideum* (Dicty, [EAL69784](#)) (Dicty2, [P34090](#)).

2.7. Função do domínio HD-GYP da proteína RpfG e proteínas contendo os domínios GGDEF e EAL, reguladores da produção de c-diGMP

A análise das seqüências genômicas de diversas espécies de procariotos depositadas em bancos de dados permitiu identificar vários domínios frequentemente associados com sistemas de dois componentes conservados em bactérias (Galperin, 2004; Galperin e Gomelsky, 2005), muitos ainda sem função determinada. Dentro deste grupo, destacamos os domínios GGDEF e EAL que tiveram suas funções determinadas somente recentemente (Romling *et al.*, 2005). O domínio GGDEF, o qual tem os resíduos de aminoácidos Gly-Gly-Asp-Glu-Phe conservados, foi demonstrado atuar como uma diguanilato-ciclase sintetizando a molécula *bis*-3'→5' diGMP cíclico (c-di-GMP; Fig. 9) a partir de duas moléculas de GTP. Em bactérias, o c-di-GMP atua como um segundo mensageiro de forma ainda não bem definida. Nas poucas espécies de bactérias em que sua função foi investigada, a alteração de sua concentração na célula esta relacionada com o comportamento agregativo, produção de celulose, formação de biofilme, resistência a antibióticos e ativação de fatores de virulência (Romling *et al.*, 2005) (Figura 10).

Figura 9. Estrutura molecular do diGMP cíclico que atua como um segundo mensageiro em bactérias.

Por outro lado, o domínio EAL, que apresenta os resíduos Glu-Ala-Leu conservados, atua como uma fosfodiesterase promovendo a diminuição da concentração do diGMP cíclico na célula. A diminuição da concentração de diGMP cíclico na célula promove aumento da resistência a antibióticos (Hoffman *et al.*, 2005), mobilidade (Drenkard e Ausubel, 2002; Simm *et al.*, 2004), virulência (Tamayo *et al.*, 2005), e tolerância a agentes oxidantes do hospedeiro (Hisert *et al.*, 2005) (Figura 10).

Figura 10. Fenótipos bacterianos controlados pelos domínios EAL e GGDEF. No lado direito estão listados os fenótipos observados quando GGDEF esta ativa, portanto ocorrendo produção de c-di-GMP na célula. No lado esquerdo estão listados os fenótipos observados em bactérias quando EAL é ativado (Romling *et al.*, 2005). EPS, exopolissacarídeo.

Dados publicados sugerem que cada domínio EAL e GGDEF pode ser um regulador específico de níveis de c-diGMP em função de diferentes sinais recebidos pela célula. Por exemplo, *Salmonella typhimurium* apresenta 18 genes que codificam proteínas com domínio EAL, entretanto, um mutante que não produz uma dessas proteínas não é capaz de

colonizar o hospedeiro, por se tornar sensível a espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células de defesa do mesmo (Hisert *et al.*, 2005). Em *Caulobacter crescentus* foi demonstrado que a funcionalidade da proteína PleD, que apresenta um domínio GGDEF em fusão com dois domínios RR, é fundamental para a diferenciação dos pólos celulares de *C. crescentus* durante o processo de divisão celular (Paul *et al.*, 2004).

Um terceiro domínio denominado de HD-GYP é muitas vezes encontrado em proteínas com função em transdução de sinal. A função desse domínio como fosfodiesterase foi proposta por Galperin *et al.*, 2001. Sua função como fosfodiesterase foi baseado pelo fato desse domínio possuir os resíduos His-Asp conservados, similarmente a outras fosfodiesterases dependentes de metais da família HD encontradas em procariotos e eucariotos (Galperin *et al.*, 2001; Slater *et al.*, 2000; Aravind e Koonin, 1998) (Fig. 11). Recentemente a função de fosfodiesterase do domínio HD-GYP de RpfG foi demonstrada por Ryan *et al.* (2006).

Domínio HD-GYP

Figura 11. Seqüência consenso do domínio HD-GYP descoberto recentemente e envolvido com sinalização celular em bactérias (Galperin *et al.*, 2001).

No genoma de *Xcc* foram identificados trinta genes que codificam proteínas com o domínio GGDEF, cinco codificam somente EAL, oito com ambos domínios GGDEF e EAL, e três com somente o domínio HD-GYP (Crossman e Dow, 2004). Esses domínios apresentam-se fusionados a outros domínios envolvidos na sinalização celular em bactérias (PAC, PAS, GAF e RR) (Crossman e Dow, 2004). Como apresentado na Tabela 3, em *Xac* são encontrados 30 genes codificando proteínas com o domínio GGDEF, 14 com o domínio EAL e 3 com HD-GYP. Uma das proteínas que apresenta o domínio HD-GYP é RpfG (XAC1877).

Tabela 3. Genes que codificam proteínas com os domínios GGDEF, EAL e HD-GYP em *Xac* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html).

Domínios		
GGDEF (30)	EAL (14)	HD-GYP (3)
XAC0258 gi 21106323 gb AAM35150.1 	XAC0495 gi 21241266 ref NP_640848.1 	XAC0350 gi 21241124 ref NP_640706.1
XAC0424 gi 21106506 gb AAM35315.1 	XAC1184 gi 21241938 ref NP_641520.1 	XAC1877 gi 21242621 ref NP_642203.1
XAC0495 gi 21106583 gb AAM35384.1 	XAC1795 gi 21242540 ref NP_642122.1 	XAC2493 gi 21243226 ref NP_642808.1
XAC0593 gi 21106693 gb AAM35482.1 	XAC1887 gi 21242631 ref NP_642213.1 	
XAC0610 gi 21106713 gb AAM35499.1 	XAC1938 gi 21242682 ref NP_642264.1 	
XAC0614 gi 21106717 gb AAM35503.1 	XAC1992 gi 21242736 ref NP_642318.1 	
XAC0644 gi 21106750 gb AAM35533.1 	XAC1993 gi 21242738 ref NP_642320.1 	
XAC1345 gi 21107507 gb AAM36216.1 	XAC2152 gi 21242887 ref NP_642469.1 	
XAC1420 gi 21107589 gb AAM36291.1 	XAC2382 gi 21243116 ref NP_642698.1 	
XAC1486 gi 21107662 gb AAM36356.1 	XAC2398 gi 21243132 ref NP_642714.1 	
XAC1488 gi 21107664 gb AAM36358.1 	XAC2711 gi 21243438 ref NP_643020.1 	
XAC1570 gi 21107752 gb AAM36438.1 	XAC2812 gi 21243539 ref NP_643121.1 	
XAC1795 gi 21107995 gb AAM36658.1 	XAC2868 gi 21243595 ref NP_643177.1 	
XAC1887 gi 21108096 gb AAM36749.1 	XAC3958 gi 21244677 ref NP_644259.1 	
XAC1938 gi 21108154 gb AAM36800.1 		
XAC1939 gi 21108155 gb AAM36801.1 		
XAC1940 gi 21108156 gb AAM36802.1 		
XAC1992 gi 21108213 gb AAM36854.1 		
XAC1993 gi 21108215 gb AAM36856.1 		
XAC2382 gi 21108634 gb AAM37234.1 		
XAC2398 gi 21108651 gb AAM37250.1 		
XAC2446 gi 21108703 gb AAM37297.1 		
XAC2482 gi 21108743 gb AAM37333.1 		
XAC2711 gi 21108991 gb AAM37556.1 		
XAC2810 gi 21109102 gb AAM37655.1 		
XAC2812 gi 21109104 gb AAM37657.1 		
XAC2897 gi 21109198 gb AAM37742.1 		
XAC3272 gi 21109614 gb AAM38116.1 		
XAC3460 gi 21109821 gb AAM38303.1 		
XAC4358 gi 21110803 gb AAM39188.1 		

Ainda não se conhecem os alvos de diGMP cíclico na célula. No entanto sabe-se que ele se liga na subunidade B (BcsB), que possui o domínio PilZ, da celulose sintase, aumentando sua atividade, dessa forma, atuando como um ativador alostérico (Ross et al., 1987; Amikan e Benziman, 1989). O domínio PilZ foi primeiramente caracterizado em *Pseudomonas aeruginosa* como uma proteína importante para montagem da fimbria tipo IV, sendo que mutantes para PilZ demonstraram ser resistentes a infecção do bacteriófago PO4, o qual interage especificamente com a fimbria tipo 4 durante o estágio inicial da infecção (Alm et al., 1996). Amikam e Galperin (2005) recentemente identificaram várias proteínas com domínio PilZ nos genomas de várias bactérias. Essas proteínas agora estão sendo estudadas para verificar se realmente suas funções são dependentes de c-diGMP cíclico (Romling e Amikam, 2006). No genoma de Xac, quatro proteínas foram encontradas com o domínio PilZ, são elas: subunidade A da celulose sintase (XAC3518), proteína formadora da fimbria (XAC1135) e duas proteínas hipotéticas (XAC1971 e XAC3402).

Objetivos

3. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos:

- 1) Confirmação das interações observadas por Alegria M.C., (2004) em sistema de dois híbridos entre as proteínas do locus *rpf* e CmfA, realizando ensaios de interações *in vitro*.
- 2) Estudo do domínio HD-GYP da proteína RpfG por ensaios de dois híbridos, com o intuito de verificar importantes interações entre esse domínio e proteínas regulatórias de *Xac* responsáveis pela expressão gênica diferencial, durante o processo de *quorum-sensing*.
- 3) Análise da expressão dos genes *rpf* e *cmfA* de *Xac* durante o aumento da densidade celular em laboratório.
- 4) Obtenção do nocaute *cmf*⁻ em *Xac* e estudo do seu fenótipo.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1. Clonagem das proteínas RpfC e seus domínios, RpfG, RpfF e CMF em vetor de expressão

Um fragmento de DNA de 1665 pb que codifica RpfC₁₇₃₋₇₂₆ (XAC1878) sem a região transmembrana amino-terminal, e o gene CMF (XAC0330, 1674 pb) foram amplificados a partir do DNA genômico de *Xac* estirpe 306 por PCR (“polymerase chain reaction”), utilizando a polimerase “Taq high fidelity” (Invitrogen). A PCR foi realizada de acordo com as instruções do fabricante no termociclador (Applied Biosystems) programado da seguinte forma: 96°C/5min; 5 ciclos a (96°C/30s; 50°C/30s; 72°C/1min 50s); 25 ciclos a (94°C/30s; 60°C/30s; 72°C/1min 50s); 72°C/(10min). Esses produtos de amplificação foram clivados com as enzimas *NdeI/HindIII* e *NdeI/XhoI*, inseridos no vetor de expressão pET28a(+) (Figura 12) nos respectivos sítios, obtendo-se a construção RpfC_{His173-726} e CMF_{His100-655}.

Os domínios de RpfC, Histidina cinase (HK_{His173-424}), Regulador de resposta (RR_{His415-613}) e Histidina fosfotransferase (Hpt_{His584-726}), foram amplificados com oligonucleotídeos específicos contendo os sítios *NdeI/BamHI*, *NdeI/BamHI* e *NdeI/HindIII*, respectivamente, e clonados entre estes sítios de restrição do vetor pET28a para expressão com cauda de histidina (6His) na porção amino-terminal. Uma forma truncada de RpfC (1352 pb) sem o domínio HK inteiro foi produzida digerindo o clone pET28aRpfC_{His173-726} com *XhoI* e *HindIII*, e clonando esse fragmento chamado RpfC_{hxHis276-726} em vetor de expressão pAE (Figura 12; Ramos et al., 2004) com cauda de histidina. Os fragmentos de RpfC clonados e expressos na cepa BL21(DE3) de *E. coli* estão esquematizados na Figura 13.

Os genes correspondentes às proteínas RpfG (XAC1877, 1137 pb) e RpfF (XAC1879, 870 pb) foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *Xac*, digeridos pelas enzimas *NcoI/EcoRI* e *NdeI/HindIII* respectivamente, e então clonados em pET28a e pET3a (Figura 12), respectivamente, para expressão sem cauda de histidina.

Os detalhes das clonagens dos genes em vetor de expressão e as sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão resumidos na Tabela 4.

Figura 12. Vetores de clonagem pET-3a (Novagen), pET-28a (Novagen) e pAE (Ramos *et al.*, 2004) utilizados para expressão heteróloga em *E. coli*.

Tabela 4. Detalhes dos genes *rpfC* e seus domínios, *rpfG*, *rpfF* e *cmf* clonados em vetor de expressão em *E. coli*.

Proteínas	Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens	Sítios de clonagem	Vetor de expressão	Quanto a His-tag	Antibiótico
RpfC _{His173-726}	Fw 5'cttcgccagccAtatgctgcgccagc 3'	<i>Nde</i> I e	pET28a(+)	+	Kanamicina
RpfC _{His276-726}	Rev 5'tataagcttgctgactattaggatcgccattaccgctg 3' (Subclone de RpfC _{His173-726})	<i>Hind</i> III <i>Xho</i> I	pAE	+	Ampicilina
RpfCHK _{His173-424}	Fw 5'cttcgccagccatattgctgcgccagc 3'	<i>Nde</i> I e	pET28a(+)	+	Kanamicina
RpfCRR _{His415-613}	Rev 5'gtgtcgggacccctgctagcg 3'	<i>Bam</i> HI			
	Fw 5'ccagcacccgccgatccgagtcaggc 3'	<i>Nde</i> I e	pET28a(+)	+	Kanamicina
RpfCHpt _{His584-726}	Rev 5'cctcgcccgatcccctattccgc 3'	<i>Bam</i> HI			
	Fw 5'gcgcctcaaccatattggtgctgc 3'	<i>Nde</i> I e	pET28a(+)	+	Kanamicina
RpfG	Rev 5'tataagcttgctgactattaggatcgccattaccgctg 3'	<i>Hind</i> III			
	Fw 5'gccatgccatggagatgttttaggaatccg 3'	<i>Nco</i> I e	pET28a(+)	-	Kanamicina
RpfF	Rer 5'agaattccctcgagtattatgctcctggagcaccga 3'	<i>Eco</i> RI			
	Fw 5'catgccatggctcatatgaacacgattgaaaagatttcctc 3'	<i>Nde</i> I e	pET3a	-	Ampicilina
CMF _{His100-655}	Rev 5'atgctcgagtattaggcgacgccatgccg 3'	<i>Hind</i> III			
	Fw 5'gagatataccatattgctgcgttca 3'	<i>Nde</i> I e <i>Xho</i> I	pET28a(+)	+	Kanamicina
	Rer 5'catctcgagttacctcgccgattcgcatc 3'				

Referências: pET-3a (Novagen); pET-28a (Novagen); pAE (Ramos *et al.*, 2004).

Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição descritas acima e purificados com o “QIAquick Gel extraction Kit” (Qiagen), e posteriormente subclonados nos vetores de expressão previamente tratados com as mesmas enzimas e fosfatase alcalina (Biolabs). Todas as digestões foram realizadas a 37°C por 12 h. Para as reações de ligação utilizou-se a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), sendo a reação processada a 16°C por 12h. Os produtos das reações de ligação foram utilizados para transformar células DH10B (eletrocompetentes), para então posterior extração dos plasmídeos usando “kit miniprep” (Quiagen). Os clones obtidos foram confirmados por sequenciamento em um sequenciador automático ABI PRISM 3700 DNA Analyzer. As reações de sequenciamento foram feitas com o kit de sequenciamento Big Dye™ Terminator (ABI PRISM) de acordo com o protocolo do fabricante.

Figura 13. Fragmentos de RpfC clonados e expressos. Esquema dos fragmentos de RpfC clonados em vetor de expressão pET28a ou pAE e expressos em *E. coli*.

4.2. Expressão e purificação das proteínas Rpf e CMF em *E. coli*

As Proteínas RpfC_{His173-726} e seus domínios (HK, RR e Hpt), RpfF, RpfG e CMF_{His100-655} foram expressas na cepa BL21(D3) de *E. coli*. O crescimento das bactérias se realizou a 37°C com agitação constante de 200 rpm, em 1 litro do meio de cultura 2xTY (16g/L triptona, 10g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl) com os antibióticos necessários para cada vetor de expressão (ver Tabela 4). Quando o crescimento das bactérias atingiu uma DO (densidade optica) a 600nm de 0.6, foi adicionado no meio IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídio) 1mM, com a finalidade de induzir a expressão das proteínas de interesse. A indução foi realizada durante 4 h contados após a adição de IPTG. As bactérias foram centrifugadas a 2200 xg, 15 minutos a 4°C, então ressuspensas em 20mL (por litro de meio de cultura) de tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 25% de sacarose e 14 mM 2-mercaptoetanol, para posterior lise celular com French-Press. Depois de lisadas as amostras foram centrifugadas a 31.000 xg, 45 minutos a 4°C, para obtenção dos corpos protéicos (fração insolúvel). Na purificação das proteínas foram padronizados protocolos particulares utilizando-se colunas de cromatografia (Q-Sepharose), concentração com sulfato de amônio ou Amicon (Millipore), filtração em gel (Superdex 200) ou afinidade “Ni²⁺-Chelating Sepharose Fast flow” (Amersham Biosciences) como descrito a seguir.

As proteínas recombinantes RpfC_{His173-726}, RpfC_{His276-726}, RpfF, RpfG e CMF_{His100-655} foram extraídas dos corpos protéicos usando 10 mL (por litro de meio de cultura) do tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 6 M de uréia e 14 mM 2-mercaptoetanol, sob agitação constante por 1h a 4°C. As amostras protéicas resolubilizadas nesse tampão foram separadas dos restos celulares por centrifugação a 31.000 xg, 45 minutos a 4°C. Posteriormente as amostras resolubilizadas foram aplicadas sob fluxo constante de 1mL/min na coluna Q-sepharose equilibrada com tampão A (50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 6 M de uréia e 14 mM 2-mercaptoetanol), e através de um gradiente de 10 volumes da coluna de cromatografia, de tampão A ao tampão B (50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 400mM NaCl, 6 M de uréia e 14 mM 2-mercaptoetanol). Frações eluídas de 10 mL foram coletadas. Depois de identificar as frações onde cada uma dessas proteínas foi eluída da coluna Q-Sepharose por meio de SDS-PAGE, as frações foram combinadas e concentradas até um volume de 10 mL com filtros de Amicon (Millipore), e então aplicadas a uma coluna com volume 318 mL de filtração em gel (Superdex 200, Amersham

Biosciences) previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 6 M uréia e 14 mM 2-mercaptoetanol sob fluxo constante de 0.8 mL/min. As frações eluídas de 5 mL foram analisadas em SDS-PAGE. Após a eluição as proteínas foram enoveladas por meio de diálises descritas na seção 4.3.

Os fragmentos RpfCHpt_{His584-726} e RpfCRR_{His415-613} quando expressos em condições ótimas de aeração apresentam uma concentração maior da forma solúvel após a lise celular. Isso nos permitiu purificar esses fragmentos por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel a partir da fração solúvel. Uma coluna de 3 mL de “Chelating Sepharose Fast flow” (Amersham Biosciences) foi lavada com 3 volumes de água e ativada com 3 volumes da solução 100mM de NiSO₄. A coluna foi novamente lavada com 5 volumes de água e equilibrada com 5 volumes do tampão C (50mM de Tris-HCl pH 8, 5mM de Imidazol, 100mM NaCl 14mM 2-mercaptoetanol). Um volume de aproximadamente 10 mL do sobrenadante proveniente de 500 mL de meio de cultura induzida por IPTG foi aplicado na coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes do tampão D (50mM de Tris-HCl pH 8, 50mM de Imidazol, 100mM NaCl e 14mM 2-mercaptoetanol). As proteínas com “His-Tag” foram eluídas com tampão E (50mM de Tris-HCl pH 8, 500 mM de Imidazol, 100mM NaCl e 14mM 2-mercaptoetanol). Frações de 0.6 mL eluídas foram coletadas em tubos eppendorfs diferentes e enumeradas. Depois de usada, a coluna foi lavada com 5 volumes de água e 5 volumes de etanol 70%, então armazenada a 4°C. As amostras foram dialisadas 4°C sob agitação no tampão contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA e 14 mM 2-mercaptoetanol para retirada do Imidazol.

4.3. Enovelamento das proteínas recombinantes por meio de diálise

Todas as proteínas RpfS que foram expressas em *E. coli* estavam presentes nos corpos protéicos (com exceção dos domínios RR e Hpt de RpfC) utilizou-se uréia 6 M para solubilizá-las durante o protocolo de purificação. Posteriormente essas proteínas foram dialisadas em diferentes condições de tampão e força iônica, cada uma otimizada para que as proteínas permanecessem em solução (ver Tabela 5).

Tabela 5. Tampões usados no reenovelamento das proteínas RpfS e CMF recombinantes expressas em *E. coli*.

Proteínas dialisadas	Tampão utilizado
RpfC _{His173-726}	5mM Tris-HCl pH 7, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol
RpfC _{His276-726}	50mM Tris-HCl pH 7, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol
RpfG	5mM Tris-HCl pH 7, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol
RpfF	5mM Acetato de Sódio pH 5, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol
CMF ₁₀₀₋₆₅₅	5mM Acetato de Sódio pH 5, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol

RpfC_{His276-726}, fragmento de RpfC que apresenta domínio HK truncado e RR e Hpt completos, é a proteína recombinante com maior solubilidade em diferentes pHs e concentrações de sal testadas. RpfC_{His173-726} e RpfG apresentam-se solúveis em Tris-HCl pH 7 (também pH 8) com forças iônicas muito baixas (5mM). Já RpfF e CMF₁₀₀₋₆₅₅ permanecem em solução quando dialisadas contra 5 mM de Acetato de Sódio pH 5.

4.4. Enovelamento de RpfF e RpfG por meio de diálise na presença de RpfC

Devido à dificuldade de trabalhar com essas proteínas nesses pH diferenciados, foi realizado um experimento para observar se através de uma reenovelação conjunta, por diálise, para remover a uréia, RpfC_{His173-726} e RpfC_{His276-726} poderiam ajudar a manter RpfF e RpfG em solução através de formação de complexos solúveis RpfC-RpfF e RpfC-RpfG. Foram utilizadas nas diálises amostras de 50 mg/mL RpfC_{His173-726}, 50 mg/mL RpfC_{His276-726}, 30 mg/mL RpfF e 30 mg/mL RpfG puras em 6M uréia. As diálises foram realizadas no tampão 50 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA e 14 mM 2-mercaptoetanol a 4°C com agitação constante por 12 h. As amostras foram coletadas e centrifugadas a 15 000 xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado do precipitado. O precipitado foi ressuspenso em tampão 50mM Tris-HCl pH=7, 6M Uréia, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 14mM 2-Mercaptoetanol. As amostras foram analisadas por meio SDS-PAGE 15%.

4.5. Produção dos anticorpos policlonais contra RpfC, RpfG e CMF e ensaios de Western blot

Para a produção de soros policlonais contra as proteínas RpfC_{His173-726}, RpfG e CMF_{His100-655} utilizamos coelhos brancos, fêmeas. Realizaram-se quatro imunizações, de 150µg de proteína cada uma, com um intervalo de uma semana entre cada inoculação. A primeira imunização se realizou na presença do adjuvante de Freud completo (1:1) (Sigma) e as três seguintes com o adjuvante de Freud incompleto (1:1) (Sigma). A obtenção do soro imune foi realizada da seguinte maneira: i) o sangue obtido foi primeiramente incubado por 30-60 minutos a 37 °C, ii) Incubado posteriormente a 4° C por 12-16 horas, para coagular, e o coágulo foi descolado da parede do tubo utilizando uma pipeta Pasteur, iii) o soro foi separado do coágulo por centrifugação a 10,000 xg, 10 minutos a 4°C, iv) finalizada a preparação do soro, este foi aliquotado e guardado a -20° C.

Para evitar interações cruzadas entre o anti-soro produzido em coelho e proteínas de *E. coli* utilizadas como controle negativo nos experimentos, os anticorpos foram limpos seguindo o protocolo baseando em Sambrook e Russel (2001). Uma cultura de *E. coli* cepa BL21(D3) foi crescida em 100mL de meio LB por 16h a 37°C. As células de *E. coli* foram centrifugadas a 2200 xg, 15 min a 4°C, o sobrenadante descartado, e as bactérias ressuspendidas em 3mL de tampão (50mM Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA). Depois de ressuspendidas, as células foram lisadas no sonicador (Fisher Scientific, modelo 500) na máxima potência (amplitude 100%) por 5 períodos de 15 segundos no gelo, e centrifugadas em microcentrífuga a 13000 xg, 4°C, por 10 minutos. Um volume de 0.5 mL do sobrenadante, lisado bacteriano, foi adicionado em 1mL da diluição (1:10) de cada anti-soro em tampão TBSTT (20mM Tris, 140mM NaCl, 0.1% Tween 20 e 0.1% Triton X-100) com 5% de leite em pó sem cálcio, e colocado para agitar constantemente a temperatura ambiente por 4h. Essa mistura foi utilizada sempre no mesmo dia em que foi preparada.

Ensaio de *Western blot* foi realizado para testar os soros policlonais produzidos contra RpfC, RpfG e CMF. Extratos de *E. coli*, expressando as respectivas proteínas recombinantes, foram resolvidos em SDS-PAGE 15%, e transferidos para membrana de nitrocelulose sob uma corrente de 60 mA durante 1 hora usando o Trans-blot SD semi-dry transfer cell (Biorad). A membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% por 1 hora, lavada 3 vezes com tampão TBSTT, então incubada com os anti-soros e soros pré-imunes coletados dos coelhos antes do início das imunizações a 4°C por 12 horas sob agitação. O soro pré-imune e anti-soros foram previamente diluídos (1:5000) em tampão TBSTT com

5% leite desnatado. Após a incubação com anti-soros e soros pré-ímmes as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão TBSTT, e incubadas com Proteína-A conjugada a Peroxidase (Sigma) diluída 1:10.000 em tampão TBSTT com 5% leite desnatado por 1 hora. Terminado a incubação com Proteína-A, as membranas foram lavadas novamente com TBSTT 3 vezes, e colocadas em contato com o substrato para Peroxidase (Kit ECL Advance Amersham Biosciences) por 1 minuto. Filmes Kodak 18x24 cm foram sensibilizados e revelados.

4.6. Dicroísmo circular de proteínas purificadas

Após as diálises nos respectivos tampões (Tabela 5), a presença de estruturas secundárias nas proteínas recombinantes foi verificada por análise de espectros de dicroísmo circular em UV distante (190-260nm) no espectropolarímetro Jasco-720, a 20°C, 100nm/min e um tempo de resposta de 4 segundos, usando cubeta com um caminho óptico de 1 mm. Os espectros mostrados são as médias de 4 varreduras individuais. Para cada análise nos usamos uma concentração de 1 mg/mL de cada proteína.

4.7. Detecção de interações entre proteínas do sistema Rpf e CMF por ensaios de *overlay*

Interações proteína-proteína podem ser detectadas por meio de “blot overlay” ou “far Western blot”. As proteínas separadas por SDS-PAGE 15%, foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham LIFE SCIENCE) e depois bloqueadas por 2 horas em tampão TBSTT. Posteriormente as membranas contendo as proteínas foram incubadas na mesma solução de bloqueio com a proteína de interesse em uma concentração de 50µg/mL durante 12 horas a fim de estudar as possíveis interações. Logo após a incubação com proteína de interesse as membranas foram lavadas quatro vezes com TBS-TT, sendo 15 minutos de duração cada uma, removendo todo o material que ligou fracamente nas membranas. Depois das lavagens as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo primário durante 1 hora em seguida foram repetidas as lavagens, e por último com Proteína-A conjugada a peroxidase. Terminado a incubação com proteína A, as membranas foram lavadas novamente com TBSTT 3 vezes, e colocadas em contato com o substrato para peroxidase fusionada com a proteína A (Kit ECL Advance Amersham Biosciences) por 1 minuto. Filmes Kodak 18x24 cm foram sensibilizados e revelados.

4.8. Extração da proteína recombinante RpfC_{His173-726} com o detergente N-Lauroil-Sarcosina (sarcosil)

Após 4 horas de indução, realizada conforme descrito no item 4.2., as bactérias foram centrifugadas a 2200 xg por 15 min a 4°C. Células bacterianas foram ressuspendidas em 25 mL de tampão STE (20mM de Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA e 14mM 2-mercaptoetanol) para cada 1 L da indução. As células foram lisadas usando French Press, e os corpos protéicos (fração insolúvel) contendo RpfC_{His173-726} recombinante foram obtidos de acordo com item 2.2. RpfC_{His173-726} então foi solubilizada com tampão STE contendo 0.3% sarcosil sob agitação constante a 25°C (Zhuo *et al.*, 2005). As amostras foram centrifugadas a 31000 xg, 30 minutos a 4°C para obtenção do sobrenadante com RpfC_{His173-726}. Posteriormente as proteínas foram passadas na coluna de gel filtração em gel (Superdex 200) em tampão STE com 0.15% sarcosil. As frações eluídas contendo RpfC_{His173-726} foram dialisadas contra tampão 20mM Tris pH 8, 20mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol.

4.9. Ensaio de ligação de RpfC_{His173-726} a ATP utilizando ATP-agarose

Nesse ensaio 30 µg da proteína RpfC_{His173-726} purificada da fração insolúvel de *E. coli*, utilizando 0.3% sarcosil e dialisadas em tampão 20mM Tris pH 8, 20mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol, foram incubados com 10 mg da resina de ATP-agarose (Sigma) previamente lavadas com o mesmo tampão. O ensaio de ligação a ATP foi realizado na presença de 1 mM dos íons Mg²⁺, Ca²⁺ ou Mn²⁺, ou sem íons divalentes. Após a incubação a resina de ATP-agarose foi lavada quatro vezes com o tampão descrito acima, e em seguida as proteínas que se ligaram a matriz de ATP-agarose foram eluídas em tampão 20mM Tris pH 8, 20mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM MgCl₂ e 20 mM de ATP. As amostras foram resolvidas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose para ser incubadas com o anticorpo contra RpfC_{His173-726} seguindo o protocolo de *Western blot* descrito no item 4.5.

4.10. Ensaio de modulação por ATP das interações entre a proteína RpfC_{His173-726} e RpfF, RpfG e CMF em placa de ELISA

A modulação das interações envolvendo proteínas do sistema Rpf e CMF por ATP foi analisada utilizando proteínas imobilizadas em placa de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), sendo a detecção realizada por meio dos anticorpos policlonais produzidos em coelho. Placas de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com cada proteína analisada com três repetições numa quantidade de 0.5 µg em tampão carbonato de sódio, 0.1M, pH 9.4, durante 18 horas, a 4°C. Após quatro ciclos de lavagens com 100 µL de tampão PBS (8 g/L NaCl; 0.2 g/L KCl; 1.44 g/L Na₂HPO₄ 7H₂O; 0.24 g/L KH₂PO₄ pH 7.4) ou PBS contendo 2 mM de ATP, as placas foram bloqueadas com solução de gelatina a 1,0% (Gibco,EUA), em temperatura ambiente, por 2h. Em sequência, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS ou PBS+2 mM de ATP, e uma concentração de 0.5 µg da segunda proteína em 100 uL de PBS ou PBS+2 mM de ATP foram adicionados aos poços. Duas horas após, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0.05% Tween (PBS-T) ou PBS-T+2mM ATP e incubadas 1h com 50 µL de anticorpo específico (1/1,000) em PBS ou PBS+2mM de ATP. Na próxima etapa depois das lavagens com PBS-T ou PBS-T+2mM ATP foi adicionada Proteína-A peroxidase (1/10,000) (Sigma, EUA) em PBS ou PBS+2mM de ATP, ficando sob incubando por 1h a temperatura ambiente.

O processo de revelação foi realizado com adição, em cada poço, de 75 uL de solução de TMB (250 uL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 6,5% em DMSO, 12 mL de tampão citrato 0.1M, pH 5,5) 10 uL de H₂O₂ 30%, substrato para enzima peroxidase. A reação foi interrompida entre 5 a 10 min após seu início, com adição de 25 uL de ácido sulfúrico 2M (Merck, Alemanha). Os resultados foram expressos em termos de D.O., avaliados por leitura em espectrofotômetro ($\lambda=450$) no leitor de Elisa Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finlândia).

4.11. Análise da expressão diferencial dos genes rpf e cmf durante o crescimento de *Xac* por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Culturas de *Xac* crescidas em 30 mL de meio NA (5 g/L Peptona, 10g/L Sacarose, 0.5g/L K₂HPO₄.3 H₂O, 0.25 g/L MgSO₄.7 H₂O, 0.05g/L Na₂S₂O₃.5 H₂O) foram coletadas nas DO_{600nm} 0.3, 0.5, 1 e 1.7 e centrifugadas a 3000 g, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular de cada amostra foi ressuspensionado em 1mL de Trizol (Invitrogen). Os RNAs totais desses precipitados foram extraídos seguindo as

especificações do fabricante. O precipitado de RNA total foi ressuspensionado em água contendo DEPC (1mL/L) pré-aquecida a 65°C. A qualidade e concentração do RNA extraído foram verificadas usando o NanoDrop ND-1000. Aproximadamente 3 µg de RNA total de cada amostra foram aplicadas em gel desnaturante 1,2% agarose e 6% formaldeído em 1X de tampão MOPS (0.2 M MOPS pH 7, 20 mM acetato de sódio e 10 mM EDTA pH 8) e corado com brometo de etídeo. Cada amostra de RNA total extraída foi tratada com RQ1 Rnase-free DNase seguindo as especificações do fabricante (Promega), para eliminar qualquer contaminação de DNA. Em seguida o RNA total de cada amostra foi novamente ressuspensionado, quantificado e a qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose.

O cDNA para cada amostra foi gerado a partir de 6 µg de RNA total usando 200 U de Transcriptase Reversa ImPromII (Promega) e 500 ng de oligonucleotídeos degenerados de 9 bp [“random primer 9 bp RPK0158” – (Amersham Biosciences)], seguindo as especificações do fabricante. As reações de qRT-PCR foram feitas com uso de um ABI PRISM 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) seguindo os parâmetros do modelo. A mistura da reação de PCR foi preparada com adição de 10 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), 800 nM de oligonucleotídeos específicos (Tabela 6) e 180 ng de cDNA. A reação foi imediatamente acoplada a análise de qRT-PCR seguindo as especificações do fabricante (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos para a reação de PCR foram desenhados usando o proGrma PRIMER EXPRESS 2.0 (Applied Biosystems) (Tabela 6). O fator de mudança para cada gene foi calculado a partir de três experimentos independentes usando a equação $2^{-\Delta C_{T1} \Delta C_{T2}}$ (Livak *et. Al.*, 2001), sendo C_T o valor variável fornecido pelo instrumento para cada reação de qRT-PCR realizada, e Δ_1 = (a diferença entre a média dos valores de C_T de três reações independentes para um gene específico numa condição e a média dos valores de C_T para o gene normalizador *nuoA* na mesma condição), e Δ_2 = (a diferença entre Δ_1 de um gene X numa condição e Δ_1 de um gene X na condição de DO_{600nm} 0.3). Desse modo, o gene *nuoA* foi usado como controle normalizador (*housekeeping gene*) para calcular o ΔC_{T1} , correspondendo ao gene XAC2704 que codifica para uma subunidade do complexo NADH-desidrogenase. A cultura celular de *Xac* crescida até DO_{600nm} 0.3 foi usada como controle para o cálculo de ΔC_{T2} dos experimentos. Um gene foi considerado diferentemente expresso se o seu valor de $2^{-\Delta C_{T1} \Delta C_{T2}}$ for duas vezes maior ou menor que o $2^{-\Delta C_{T1} \Delta C_{T2}}$ do mesmo gene na condição de DO_{600nm} 0.3.

Tabela 6. Genes e primers usados no RT-PCR quantitativo.

Identificação ¹	Gene	Produto	Oligonucleotídeo F	Oligonucleotídeo R
XAC1877	<i>rpfG</i>	Regulador de resposta	5'gcgatctgggattgaaca 3'	5'ggcgcgatgtcctcgat 3'
XAC1878	<i>rpfC</i>	Histidina cinase híbrida	5'ggcccgatagcgaacatg 3'	5'tgcggcaacaacacatacg 3'
XAC1979	<i>rpfF</i>	Enoil-CoA hidratase	5'tgggcgcatactcttct 3'	5'gcgtccttcgagaatgatttc 3'
XAC1980	<i>rpfB</i>	Acil-CoA ligase	5'cacttcgctgttacctgctt 3'	5'ggcagttgggcatcatcag 3'
XAC2583	<i>gumD</i>	Glicosiltransferase	5'ggcgagaccccggaact 3'	5'gaccaacggcggatgtagtc 3'
XAC0330	<i>cmf</i>	<i>Conditioned medium factor</i>	5'acgcagcttgctgtctgtacct 3'	5'gttgagcgtgagcgattgg 3'
XAC2704 ^{HK}	<i>nuoA</i>	Oxirredutase NADH-ubiquinona, subunidade NQO7	5'ttgccgagctgtctgtttct 3'	5'ggaatcgaccgaccaacatc 3'

¹de acordo com da Silva *et al.*, 2002.

^{HK}Housekeeping.

4.12. Obtenção do clone pOBD-RpfG_{HD-GYP (190-379)}

Um fragmento de DNA de 600 pb que codifica o domínio HD-GYP da RpfG (aminoácidos 190-379) foi amplificado com os seguintes oligonucleotídeos: “Forward” 5'cgcgcgccatggagtaccgcgactc 3' e “Reverse” 5'agaattcctcgagtattatgctcctggacgcaccga 3' por PCR [94°C/3min; 5 ciclos a (94°C/30s; 50°C/30s; 72°C/1min 50s); 25 ciclos a (94°C/30s; 60°C/30s; 72°C/1min50s); 72°C/10min] partir do DNA genômico de *Xac*. Este produto de PCR foi clivado com as enzimas *NcoI/XhoI*, então inseridos no vetor pOBD (Uetz *et al.*, 2000) (Figura 14) nos sítios de *NcoI/Sall*, obtendo-se a construção pOBD-RpfG_{HD-GYP(190-379)}. A construção foi confirmada usando enzimas de restrição e por sequenciamento.

A **B**

Figura 14. Vetores pOBD e pOAD (Uetz *et al.*, 2000) **A)** Mapa do vetor pOAD. A marca de seleção *LEU2* e a porção do gene que codifica a ativação da transcrição (AD) de Gal4 são mostrados e **B)** mapa do vetor pOBD-2. O domínio e ligação com o DNA (BD) de Gal4 e a marca de seleção TRP1 são mostradas.

4.13. Ensaio de dois híbridos usando domínio RpfG_{HD-GYP} (190-379) como isca

A linhagem de *Sacharomyces cerevisiae* PJ69-4a (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) foi usada para os ensaios de dois híbridos (JAMES et al, 1996). A metodologia de transformação foi feita segundo o protocolo descrito por GIETZ e colaboradores (1998) obtido em www.research.bmn.com.

A partir da composição básica do meio de cultura SC (bases nitrogenadas de leveduras sem aminoácidos 0,66%, glicose 2%, mistura de aminoácidos acrescida de adenina e uracila 0,083%, ágar bacteriológico (somente para meio sólido) 1,6% e pH 5,6) diversas variações foram feitas de acordo com o tipo de seleção desejada, variando os componentes da mistura de aminoácidos acrescida de adenina e uracila (m/m: Ade 5%; Arg 5%; His 5%, Ile 5%; Leu 10%; Lys 5%; Met, 5%; Phe 8%; Ser 5%; Thr 5%; Trp 8%, Tyr 5%; Ura, 3% e Val 23,5%). As combinações obtidas foram: SC-Trp (sem triptofano), SC-Leu (sem leucina), SC-Trp-Leu-His (sem triptofano, leucina e histidina) e SC-Trp-Leu-His-Ade (sem triptofano, leucina, histidina e adenina).

Anteriormente ao ensaio de dois híbridos foram realizados testes de auto-ativação para determinar a concentração ótima de 3 amino-triazol (3-AT), um inibidor competitivo na biossíntese de histidina, a ser utilizada na triagem. O clone pOBD-RpfG^{-HD-GYP(190-379)} não cresceu em meio mínimo SC-Trp contendo 3mM de 3-AT (Sigma) sendo esta concentração utilizada para ensaios posteriores.

Células PJ69-4^a, previamente transformadas com pODB-RpfG^{HDGYP190-379}, foram inoculadas em 50 mL de meio SC-Trp e incubadas sob agitação a 30°C por 16 horas. Após este período, foi medida a OD_{600nm} e calculado o volume de pré-inóculo necessário para a obtenção de um total de $7,5 \times 10^8$ células, as quais foram centrifugadas, inoculadas em 150 mL de meio YAPD [extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, adenina 0,008% e ágar bacteriológico (somente para meio sólido) 1,6%] e incubadas a 30°C por aproximadamente 4h, sob agitação. Depois deste período foi medida a absorbância em OD_{600nm}, a qual deve atingir um valor de 2, o que corresponde a aproximadamente $2,0 \times 10^7$ UFC/mL.

A cultura foi então dividida em três tubos Falcon de 50 mL e centrifugada a 1500 xg por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas em 25 mL de água estéril. Em seguida elas foram ressuspensas em um único tubo com 3mL de acetato de lítio (100 mM). A solução foi incubada a 30°C por 15 min, em banho-maria. Após esse período a solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao “pellet” foram adicionados os seguintes componentes: 7,2mL PEG 50%; 1,08mL acetato de lítio 1,0M; 1,5mL DNA espermatozoides de salmão (2mg/mL); 30 µL da biblioteca genômica de *Xac* (1µg/µL) e 970 µL H₂O. A biblioteca contendo os genes de *Xac* clonados no vetor pOAD (Figura 14) foi produzida e testada por Alegria *et al.* (2004). A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada em banho-maria a 30°C por 30 min, agitando-se bem o tubo a cada 10 min corridos. Após este procedimento, a mistura foi submetida ao choque-térmico a 42°C durante 45 min. No decorrer do tempo, o tubo era invertido a cada 5 min. Posteriormente ao choque-térmico, a mistura foi centrifugada a 1500 xg por 5 min e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 10 mL de água ultrapura estéril e foram plaqueados 700 µL da solução em 14 placas (150x15mm) contendo meio SC-Trp-Leu-His + 3mM 3-AT. Em outra placa contendo SC- Trp Leu, foram plaqueados

100 µL de uma diluição 1:100 da mistura (controle para calcular o número de transformantes totais). As placas foram incubadas a 30°C durante 14 dias

Os clones positivos (cresceram em meio SC-Trp-Leu-His + 3mM 3-AT) obtidos através do ensaio de dois híbridos foram repicados em placas contendo meio SC-Trp-Leu-His-Ade + 3-AT e incubados a 30°C por 4 dias. Estes clones eram considerados positivos pois foram capazes de ativar simultaneamente os gene repórteres GAL2-ADE2 e GAL1-HIS3.

O DNA plasmidial foi isolado das leveduras (Sambrook) e utilizados na eletroporação de células bacterianas KC8 (*hsdR*, *leuB600*, *trpC9830*, *pyrF::tn5*, *hisB463*, *lacDX74*, *strA*, *galU,K*). Os clones contendo pOAD foram selecionados em meio M9/glicose-Leu [1x solução de sais M9 (60g/L Na₂HPO₄; 30g/L KH₂PO₄; 10g/L NH₄Cl; 5g/L NaCl) 0.2% glicose; 1mM MgSO₄; 0.1 mM CaCl₂; 32mg/L Trp; 16mg/L His; 16mg/L uracil; 1.2% Agar] contendo 100µg/mL de Carbenicilina e DNA plasmidial desses clones foram isolados para serem seqüenciados. O seqüenciamento seguiu o protocolo “save money”, sugerido pela Applied Biosystems (Big Dye Terminator vs. 3.0). Foi utilizado um oligonucleotídeo de iniciação que hibridiza no sítio múltiplo de clonagem, “forward” (5’cagggatgtttaataccactacaatg3’). A análise das seqüências foi realizada com base ao banco de dados do genoma de *Xac* (<http://genoma4.iq.usp.br>) (Silva *et al.*, 2002).

4.14. Condições de cultivo de células de *Dictyostelium discoideum* e ensaio de crescimento com *Xac*

As linhagens selvagens DH1 e o mutante DH1*cmf*- de *D. discoideum* (Jain e Gomer, 1994) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Richard H. Gomer (Rice University, Houston-Texas, EUA). Linhagens de *D. discoideum* foram cultivadas em placas de meio SM [peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,1% (p/v), MgSO₄ 0,1% (p/v), dextrose 0,2% (p/v), ágar 2% (p/v) e KH₂PO₄ 20 mM, pH 6,8] adicionado de 20µg/mL de uracil (1mg/mL) e 5% de uma mistura de vitaminas (www.dictybase.org/techniques), como descrito por Sussman (1987). Para iniciar uma cultura, uma alçada de bactérias *Klebsiella aerogenes* (KA), gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Aline Maria da Silva, crescidas em meio LB sólido (10 g/L Triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl, 1% ágar) foi dissolvida em 0,2 mL de meio LB ou SM líquido (sem agar) e misturados com uma

pequena porção de corpos de frutificação maduros de *Dictyostelium*, cepa DH1 selvagem. As misturas contendo os corpos de frutificação de *Dictyostelium* e *KA* foram espalhadas com a alça de vidro nas placas com meio SM. Já no caso dos mutantes DH1 cmf^- , aproximadamente 10^6 de células amebóides crescidas em 50 mL de meio líquido HL-5 [proteose peptona nº2 1% (p/v), glicose 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e KH_2PO_4 20 mM, pH 6,8, acrescidos de 1 mL de uracil (1mg/mL), 2,5 mL de vitaminas 20x (www.dictybase.org/techniques) e 100 unidades/mL de penicilina-streptomicina (LIFE TECHNOLOGIES)] foram plaqueadas nas mesmas condições descrita acima para a cepa selvagem com *KA*. As placas foram mantidas a 22°C até a formação de novos corpos de frutificação ou formação do halo de crescimento, no caso do mutante DH1 cmf^- , e guardadas a 4°C por 15 dias, quando um novo estoque era feito.

Estoques de células de *D. discoideum* também foram mantidos a -80°C. Para tal, o sedimento de 5×10^7 células em crescimento foi ressuspendido em 2 mL de uma solução contendo HL-5 e DMSO 10% (v/v) e em seguida congelado em gelo seco e imediatamente armazenado a -80°C. Esses estoques de células congeladas foram utilizados periodicamente como fonte de material para dar início a novas culturas em meio de crescimento sólido. Para iniciar uma cultura a partir de células congeladas, células de *Dictyostelium* foram descongeladas na presença de 500 µL de uma suspensão de bactérias *K. aerogenes*. A suspensão obtida foi semeada em meio SM, como descrito anteriormente. As células plaqueadas dessa forma foram monitoradas quanto ao início do período de desenvolvimento. Nesta ocasião, foram transferidas para um frasco contendo meio de cultura HL-5 sob agitação de 200 rpm a 22°C. Essas culturas foram mantidas com uma densidade celular entre 2 e 6×10^6 células/mL (crescimento exponencial).

Os ensaios de crescimento das cepas DH1 e DH1 cmf^- de *D. discoideum* com *Xac*, foram realizados conforme descrito acima para *K. aerogenes* em meio SM sólido. As imagens foram obtidas com a lupa Nikon modelo CD-S com vários aumentos, e fotografadas com a câmera Nikon Coopix 995.

4.15. Obtenção do nocaute para *cmf* em *Xac*

O gene *cmf* da *Xac* foi amplificado do DNA genômico de *Xac* utilizando os oligonucleotídeos direto 5' gggatccagcgtggctgcgcttc 3' e reverso 5' catctcgagttacctcgccgcattcgattc 3' por PCR conforme descrito no item 2.1. Em seguida o fragmento amplificado foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *Sall* e clonado no vetor pAE nos sítios de *BamHI* e *XhoI*. O vetor pAE não apresenta gene de resistência a kanamicina e não replica em *Xac*.

Para produção de nocautes utilizou-se o transposon *EZ::Tn5<Kan2>* (Figura 15) (Epicentre). Após uma reação *in vitro* do plasmídio pAE-*cmf* com a transposase seguindo as instruções do fabricante, células competentes da cepa DH10B de *E. coli* foram transformadas e plaqueadas em meio LB com 50 µg/mL de ampicilina e kanamicina. Para as colônias selecionadas, isto é as que cresceram na placa, fez-se PCR utilizando os oligonucleotídeos citados acima, com o intuito de encontrar os clones com o transposon inserido no meio do gene *cmf* (Figura 16) (facilitando a ocorrência da dupla recombinação em *Xac*). O DNA plasmidial desses clones com transposon inserido foi extraído com “kit miniprep” (Quiagen), e o local exato de inserção do transposon *EZ::Tn5<Kan2>* no gene *cmf* foi confirmado por sequenciamento utilizando os primers KAN-2-RP1 e KAN-2-FP-1 (Epicentre). A construção foi designada pAE-*cmf::kan*. Células eletrocompetentes de *Xac* estirpe 306 foram preparadas como descrito na seção 2.16, transformadas com plasmídio contendo *cmf* nocauteado e plaqueadas em meio LB com 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de kanamicina para selecionar os recombinantes. Os mutantes foram confirmados por PCR e *Southern blot* com sonda marcada com fluoresceína de acordo com instruções do fabricante (Fermentas) (Sambrook e Russel, 2001).

4.16. Transformação de *Xac* (306) por eletroporação

Células de *Xac* (linhagem 306) foram preparadas para serem transformadas por eletroporação de acordo com Sun *et al.*, (2003). Bactéria foi inoculada em placa contendo meio LB com 50 µg de ampicilina. Após o crescimento de aproximadamente 48 horas a 30 °C, um alça da bactéria foi transferida para 20 mL de meio Circlegrow (40g/L) (BIO 101 Systems – Q Biogene) e após o crescimento a 30 °C e 200 rpm durante a noite, transferiu-se todo o volume da cultura para 500 mL do mesmo meio. As células foram crescidas a 30 °C

e 200 rpm até atingir uma densidade óptica entre 0.5-0.6 a 600 nm, e em seguida, foram incubadas em gelo por 20 minutos e separadas por centrifugação a 4400 xg por 15 min. As células foram lavadas com 50 mL de glicerol 10% gelado, a seguir, com 20 mL e, posteriormente, com 10 mL. No final, as células foram ressuspensas em 300 µL de 10% glicerol e utilizadas na transformação ou aliqüotadas e guardadas a -80 °C.

Uma quantidade de 10 µg da construção plasmidial pAE-*cmf::kan* contendo o transposon na posição 1086 pb do gene foi homogeneizada com 50 µL de células na cubeta de eletroporação 0.2 mm (Biorad) em gelo. As células foram transformadas nas seguintes condições: 2400 Volts, capacitância de 25 µF, e resistência de 300 Ω em um eletroporador Gene Pulser II (Bio-rad). Após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio 2xYT e incubou-se a 30 °C com agitação de 200 rpm por 2 horas. As células foram plaqueadas em meio LB contendo 50 µg/mL de kanamicina (seleção para o transposon) e 100 µg/mL de ampicilina.

Figura 15. Mapa de restrição do Transposon EZ-Tn5<Kan-2> (Epicentre).

Figura 16. Esquema mostrando a reação de inserção do transposon no gene de interesse *in vitro* (Epicentre).

4.17. Confirmação do mutante *cmf::kan* por *Southern blot*

Células selvagem e mutante (*cmf::kan*) de *Xac* foram crescidas em 5 mL de meio 2xYT com contendo 100 µg/mL de ampicilina para todas as cepas e 50 µg/mL de kanamicina somente para as cepas mutantes, e crescidos durante 12 h, 30 °C a 200 rpm. As células foram coletadas em tubos de eppendorf por centrifugação 3500 xg à temperatura ambiente por 10 minutos, e lavadas com tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7).

O DNA genômico das células foi extraído com o reagente DNAzol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, o DNA genômico foi quantificado, e 8 µg de cada amostra foram digeridos com a enzima *Pst*I por 12 h a 37°C. Toda a reação foi corrida em gel de agarose 1% com tampão TAE, e a posteriore, o gel foi mergulhado em solução de HCl 0.25 M por 15 minutos para ocorrer uma leve depurinação, lavado com solução de NaCl 1.5 M e NaOH 0.5M por 20 minutos, e novamente mergulhado numa solução de NaCl 1.5 M e 0.5 M Tris-HCl (pH 8) durante 20 minutos.

Em seguida, o gel foi lavado com solução 10X SSC (NaCl 0.3 M e citrato de sódio 0.03 M), e o DNA digerido foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond, Amersham) por capilaridade em tampão 10X SSC por 12 horas, e então, fixado a membrana por *crosslinking* (Ultraviolet Crosslynker UVP, modelo CL-1000). Após a fixação, a membrana foi pré-hibridizada a 65 °C com a solução de pré-hibridização [acetato de sódio 0.5 M (pH 7.2), EDTA 1 mM, SDS 7%]. A sonda foi preparada durante a pré-hibridização, para isso, o fragmento de aproximadamente 600 pb da extremidade 3' do gene *cmf* de *Xac*, foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos Direto (5' cgagagcatgcgccatgggcc 3') e Reverso (5' catctcgagttacctcgccgcattcgattc 3'). Aproximadamente 1 µg do fragmento de 600 pb da região 3' do gene *cmf* foram marcados com fluoresceína usando kit Fluorescein ULS labeling (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, e usado como sonda. A sonda e 100 µg/mL de DNA de salmão foram desnaturados, adicionados a solução de pré-hibridização, e deixados durante 16 horas a 65 °C.

Terminada a etapa de hibridização, a temperatura foi baixada até 55 °C por 2 horas. A seguir, a membrana foi lavada com 1X SSC e SDS 0.1% a temperatura ambiente por 15 minutos, e posteriormente, lavada três vezes com solução de 0,1X SSC e 0.1% SDS por 15 minutos cada lavagem, sendo as duas primeiras realizadas a 55 °C e a última lavagem a temperatura ambiente. Filme Kodak 18x24 cm foram sensibilizados com a membrana e revelados.

4.18. Ensaios de crescimento do mutante *cmf::kan* em diferentes condições

As cepas mutantes de *Xac cmf::kan* e selvagem foram inoculadas em 3 mL de meio NA (5 g/L Peptona, 10g/L Sacarose, 0.5g/L K₂HPO₄.3 H₂O, 0.25 g/L MgSO₄.7 H₂O, 0.05g/L Na₂S₂O₃.5 H₂O), NYGB (5g/L Peptona, 3g/L extrato de levedura e 20g/L de glicerol), 2xYT (16g/L triptona, 10g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl), L (10 g/L Triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl e 1 g/L D-glicose) e LB (10 g/L Triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl) contendo 100 µg/mL de ampicilina para todas as cepas e 50 µg/mL de kanamicina somente para as cepas mutantes, e crescidos durante 12 h, 30 °C a 200 rpm. Nos meios NA e LB sólidos as cepas mutantes e selvagens foram estriadas a partir do estoque de *Xac* em 50% glicerol guardado a -80 °C, e crescidas durante 2 dias a 30°C.

4.19. Ensaio de formação de biofilme e análise da estrutura macroscópica das colônias formadas por cepas selvagem e mutante (*cmf::kan*)

As cepas selvagem e mutante de *Xac cmf::kan* crescidas em placas em meio LB com antibióticos específicos foram inoculadas em 3 mL de meio L com 100 µg/mL de ampicilina para todas as cepas e 50 µg/mL de kanamicina somente para as cepas mutantes, e colocadas para crescer a 200 rpm, 16 h e a 30°C até atingirem uma DO_{600nm} de aproximadamente 1.5. A cultura de cada cepa foi diluída até DO_{600nm} de 0.1, sendo que 5 µl de cada amostra foi adicionada em 3 mL de meio líquido L nos tubos de ensaio de vidro contendo os antibióticos específicos, e 2 µl da diluição em placas com meio LB + 0.5% ágar + 0.5% glicose. As cepas foram crescidas por 48h sob uma rotação constante de 200 rpm e a 30°C em meio L líquido, e durante 48h em meio LB + 0.5% ágar + 0.5% glicose a 30°C. Para cada cepa foram feitas três inoculações independentes. Para verificar a formação de biofilme na parede dos tubos de ensaio de vidro, os meios contendo as bactérias foram descartados, para então os vidros serem lavados 3 vezes com água destilada, e corados com cristal violeta 0.1%, e lavados 5 vezes com água.

As morfologias macroscópicas das colônias, formadas pelas cepas selvagem e mutante, foram analisadas por meio de observações na Lupa Nikon modelo CD-S com um aumento de 40X, e fotografadas com a câmera Nikon Coopix 995 no laboratório do Prof. Ronaldo Quaggio (IQ-USP).

4.20. Análise da produção de goma xantana nas cepas selvagem e mutante *cmf::kan* *in vivo*

Para medir a produção do exopolissacarídeo, goma xantana, nas cepas selvagem e mutante *cmf-* de *Xac*, ambas foram inoculadas em 50 mL de meio líquido L contendo 100 µg/mL de ampicilina para todas as cepas, e 50 µg/mL de kanamicina somente para as cepas mutantes, e crescidas durante 16 h, 30 °C a 200 rpm até atingirem a DO_{600nm} 3.0. A goma xantana foi precipitada do sobrenadante das culturas com a adição de 2 volumes de etanol e 1% de KCl, seguido de centrifugação a 3500 g, 30 minutos a 4°C. O precipitado foi coletado, seco a 37 °C e pesado (Vojnov *et al.*, 1998). O experimento foi realizado em duplicata.

4.21. Ensaio de patogenicidade do mutante *cmf::kan* em plantas de *Citrus spp*

As células mutantes foram avaliadas *in vivo* em relação à capacidade de induzirem os sintomas do cancro cítrico em folhas jovens de laranja Doce e limão Cravo. Este experimento foi realizado em uma casa de vegetação específica para o trabalho com *Xac*, localizada na FCAV, UNESP, Jaboticabal, com a colaboração do Dr. Júlio C. F. de Oliveira. Para isso, as células selvagens e mutantes foram plaqueadas em meio LB contendo ou não 50 µg/mL de kanamicina (para células mutantes). Após o crescimento (42 horas), uma pequena quantidade de células foi ressuspensa em 200 µL de tampão fosfato 0.1 M, pH 7 e a concentração bacteriana foi ajustada para uma densidade óptica de 0.3 a 600 nm. As suspensões bacterianas foram utilizadas para inocular folhas jovens de laranja doce e limão cravo. O inóculo foi feito no dorso da folha, onde, primeiramente, foi realizada uma injúria (pequena lesão), na cutícula da folha, com a ponta de uma agulha e, posteriormente, as células foram inoculadas no local da injúria, através de compressão, usando uma seringa de 1 mL sem agulha, até que fosse observada uma região úmida ao redor da injúria. Em cada folha foram aplicadas as células mutantes e selvagens. As plantas foram mantidas no laboratório de plantas (FCAV, UNESP, Jaboticabal), com luz artificial, temperatura de 28 °C e equipamento para filtração de ar (filtro HEPA).

Resultados

5. Resultados

5.1. Clonagem dos genes *rpfs* e *cmf* em vetor de expressão em *E. coli*

Os genes *rpfc* (sem a região codificadora para porção transmembrana), *rpfg*, *rpff* e *cmf* (faltando os cem aminoácidos iniciais) foram amplificados (Figura 17) e clonados nos vetores de expressão pET28a, com exceção de *rpff* que foi clonado no pET3a.

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% (corado com brometo de etídio) dos produtos de PCR amplificados dos genes *rpfs* e *cmf* clonados em vetor de expressão. M, marcador de peso molecular (Biolabs); *rpfc*₁₇₃₋₇₂₆, *rpff*, *rpfg* e *cmf* foram amplificados usando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1 em Materiais e Métodos).

5.2. Produção das proteínas recombinantes

Os fragmentos de DNA codificadores das proteínas RpfC_{His173-726} (60.728 KDa), RpfC_{His276-726} (48.777 KDa), RpfG (42.199 KDa), RpfF (32.007 KDa), CMF_{His100-655} (60.960 KDa), e dos domínios RpfCHK_{His173-424} (29.366 KDa), RpfCRR_{His415-613} (23.157 KDa) e RpfCHpt_{His584-726} (17.537 KDa) clonados em vetor de expressão foram inseridos na cepa BL21D3 de *E. coli* por eletroporação. Os polipeptídios foram produzidos em larga escala crescendo os clones em meio de cultura 2xYT com os antibióticos específicos para cada clone em particular (ver Tabela 4 de Materiais e Métodos). A cultura foi crescida a 37°C com agitação constante de 200 rpm. Quando o crescimento das bactérias atingiu uma DO (densidade óptica) a 600nm de 0.8, adicionou-se no meio IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranos) 1mM, com a finalidade de induzir a expressão das proteínas de

interesse. Obtivemos uma boa expressão das proteínas, como se pode observar nos géis das Figuras 18, 19 e 20.

Figura 18. Gel SDS-PAGE mostrando a indução das proteínas Rpf's e CMF em *E. coli*. Resultado de indução das proteínas em larga escala analisado por SDS-PAGE 15%. M, Marcador; BL21D3, controle negativo; Indução da proteína RpfC₁₇₃₋₇₂₆ (60.728 KDa); Indução da proteína RpfG (42.199 KDa); Indução da proteína RpfF (32.007 KDa); Indução da proteína CMF (60,960 KDa). S (Fração Solúvel), I (Fração Insolúvel). Círculos coloridos indicam a mobilidade das proteínas recombinantes.

Figura 19. Gel SDS-PAGE mostrando a indução de RpfC_{His276-726} em *E. coli*. Indução da proteína RpfC_{His276-726} (48.777 kDa) clonada no vetor de expressão pAE. M representa o marcador; BL21D3 controle negativo; RpfC_{xh} é o clone não induzido (NI) e induzido (I). Círculo vermelho representa a mobilidade da proteína recombinante.

Figura 20. Gel SDS-PAGE mostrando indução dos fragmentos HK, RR e Hpt de RpfC. Resultado de indução das proteínas em larga escala analisado por SDS-PAGE 15%. M, representa o Marcador; BL21D3, controle negativo; Indução da proteína RpfCHK_{His173-424} (29.366 kDa); Indução da proteína RpfCRR_{His415-613} (23.157 kDa); Indução da proteína RpfCHpt_{His584-726} (17.537 kDa). S (Fração Solúvel) e I (Fração Insolúvel). Círculos coloridos indicam a mobilidade das proteínas recombinantes.

5.3. Purificação das proteínas recombinantes

Após a expressão heteróloga das proteínas na cepa BL21D3 de *E. coli*, as células foram lisadas por French Press e as proteínas solúveis separadas das insolúveis (corpos protéicos) mediante centrifugação, para posterior purificação. Todos os polipeptídios induzidos, com exceção dos domínios RR e Hpt de RpfC, foram encontrados em corpos protéicos (Fig. 18 e 20) . Por isso, utilizamos uréia 6M para solubilizar as proteínas e durante todo o processo posterior de purificação.

Para todas as proteínas, com exceção dos domínios RpfCRR_{His415-613} e RpfCHpt_{His584-726} que foram purificados em coluna de afinidade (Ni²⁺-Sepharose), as técnicas de purificação utilizadas corresponderam à cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose),

concentração em amicon, seguida de cromatografia em gel filtração (Superdex-200). Os graus de pureza obtidos para as proteínas podem ser observados na Figura 21.

Figura 21. Gel SDS-PAGE das proteínas Rpf's e CMF purificadas. A) Os polipeptídeos RpfG, CMF_{His100-655}, RpfF, RpfC_{His173-726} (RpfC) e RpfC_{His276-726} (RpfCxh) purificados por cromatografia de troca-iônica seguida de gel filtração, e B) Os domínios RpfCHpt_{His584-726} e RpfCRR_{His415-613} purificados por cromatografia de afinidade foram resolvidas em gel SDS-PAGE 15%. Os números 1, 2 e 3 indicam diferentes frações de 0.6 mL coletadas na eluição (ver Materiais e Métodos seção 4.2.).

5.4. Diálises: Um enovelamento cooperativo entre RpfC/RpfF e RpfC/RpfG

O enovelamento das proteínas foi realizado por meio de inúmeras tentativas de encontrar condições ótimas para a estabilização das mesmas na forma solúvel através de sucessivas diálises. Cada diálise foi realizada a 4°C durante um período de 16 h. A uréia foi retirada de maneira gradual, passando de 8 M a 6 M, 4 M, 2 M e finalmente para o tampão sem uréia. Amostras das proteínas puras RpfC_{His173-726}, RpfC_{His276-726}, RpfF e RpfG purificadas na presença de 6 M uréia foram dialisadas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 14 mM 2-mercaptoetanol. RpfC_{His173-726} apresentou pouca solubilidade nessas condições mas sua concentração no sobrenadante aumenta

conforme diminui a força iônica durante o enovelamento (dados não mostrados). O fragmento RpfC_{His276-726} apresenta grande solubilidade nessas condições suportando alta força iônica do meio. RpfG não precipita quando o enovelamento é realizado em tampão com baixa força iônica como 5mM Tris-HCl pH 7, 1mM EDTA e 14mM 2-mercaptoetanol. Já RpfF apresenta maior dificuldade de permanecer no sobrenadante. A única condição testada que obtivemos êxito em obter parte da fração de RpfF em solução foi usando baixa concentração de íons e pH ácido (5mM de Acetato de Sódio pH 5, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol). Análise de CD das proteínas recombinantes dialisadas nos tampões específicos (Tabela 5 Materiais e Métodos) foram feitas para verificar a presença de estruturas secundárias (Figura 22). Todas as proteínas apresentaram espectros característicos de proteínas em que uma fração significativa do polipeptídeo esta enovelada.

Nas misturas de RpfC_{His276-726}/RpfF e RpfC_{His276-726}/RpfG dialisadas nas condições citadas observamos que RpfF e RpfG ficaram totalmente no sobrenadante diferentemente o que ocorre quando dialisadas sozinhas nas mesmas condições. Esse resultado indica que a presença de RpfC_{His276-726} pode estar favorecendo o enovelamento de RpfF e RpfG nessas condições (Figura 23).

Figura 22. Análise de Dicroísmo circular mostrando que as proteínas recombinantes apresentam estruturas secundárias depois do enovelamento *in vitro*. RpfC = RpfC_{His173-726} e RpfG foram dialisadas em 5 mM Tris-Hcl pH 7 1 mM EDTA e 14 mM 2-mercaptoetanol.

RpfF e CMF=CMF_{His100-655} foram dialisadas em 5mM Acetato de sódio pH 5, 1 mM EDTA e 14 mM 2-mercaptoetanol. Para todas as proteínas utilizou-se a concentração de 1 mg/mL.

Figura 23. Gel SDS-PAGE mostrando o enovelamento cooperativo entre proteínas Rpfs. Amostras de RpfC_{His173-726}, RpfC_{His276-726}, RpfF, RpfC_{His276-726}/RpfF, RpfG e RpfC_{His276-726}/RpfG dialisadas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 14mM 2-mercaptoetanol, e resolvidas em gel SDS-PAGE 15%. A) Mostra a cooperatividade entre RpfC_{His276-726}/RpfF durante o enovelamento, e B) entre RpfC₂₇₆₋₇₂₆/RpfG. SN, representa o sobrenadante; P, proteína precipitada; RpfC, RpfC_{His173-726}; RpfC_h, RpfC_{His276-726}; F, RpfF; G, RpfG; M, marcador de peso molecular.

5.5. Teste dos Anticorpos para RpfC, RpfG e CMF

Para demonstrar a funcionalidade dos anticorpos produzidos foi realizado ensaio de *Western blot*. Amostras de proteínas totais da cepa BL21D3 de *E. coli* expressando RpfC_{His173-726}, RpfG e CMFA_{His100-655} foram resolvidas em SDS-PAGE 15%, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com respectivos anti-soros e soros pré-ímunos dos coelhos imunizados (Figura 24). Os anti-soros e soros pré-ímunos foram anteriormente tratados com lisado de *E. coli* para retirada de anticorpos inespecíficos e com reação cruzada (item 4.5. Materiais e Métodos).

Figura 24. Western-blot mostrando a funcionalidade dos anti-soros produzidos em coelho contra RpfC, RpfG e CMF. Extratos protéicos totais de *E. coli* expressando RpfC_{His173-726}, RpfG e CMF_{His100-655} foram sondados com respectivos anti-soros e soros pré-ímenes. AS, representa proteínas sondadas com anti-soro, e PI com soro pré-íme.

5.6. Análise de interações entre proteínas do sistema Rpf e CMF por *Overlay*

Para demonstrar interações entre RpfC/RpfF, RpfC/RpfG e RpfC/CMF *in vitro* verificamos primeiramente se o anticorpo policlonal contra RpfC não reconhece RpfF, RpfG e CMF em experimento de *Western blot* (Figura 25A).

Aproximadamente 15 µg de cada proteína RpfF, RpfG, CMF_{His100-655} e controles negativos (HpaA-XAC0400, e XAC2609) foram resolvidos em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Posteriormente, essas proteínas foram incubadas com 50 µg de RpfC_{His276-726}, anticorpo contra RpfC (1/5,000) e Proteína-A conjugada a peroxidase (1/10,000). Nesse experimento vimos que RpfC_{His276-726} interagiu com RpfF, RpfG e CMF_{His100-655}, mas não com os controles negativos (HpaA e XAC2609) (Figura 25B). Esses resultados sugerem que o domínio cinase de RpfC não é necessário para sua interação com RpfG, RpfF e CMF.

As proteínas RpfF, RpfG e CMF_{His100-655} também foram incubadas com 50 µg dos domínios RpfCRR_{His415-613} e RpfCHpt_{His584-726}. RpfF interagiu somente com domínio RpfCRR_{His415-613} confirmando o domínio mínimo de interação encontrado no ensaio de dois híbridos (Alegria, 2004). Contudo RpfG e CMF_{His100-655} interagiram com ambos domínios, RpfCRR_{His415-613} e RpfCHpt_{His584-726} (Figuras 25C, 25D e 25E).

Figura 25. *Western blot* e *Overlay* demonstrando interações *in vitro* entre proteínas do sistema Rpf e CMF. **A)** *Western-blot* utilizando anticorpo anti-RpfC, aproximadamente 15 µg de CMF_{His100-655}, RpfF, RpfG, HpaA e XAC2609 foram separadas em gel SDS-PAGE 15%, transferidas para membrana de nitrocelulose, e sondadas com anticorpo. **B)** *Overlay*, a membrana contendo as proteínas foram primeiramente incubadas com 50 µg de RpfC_{His276-726}, em seguida sondadas com anticorpo contra RpfC, e finalmente com Proteína-A conjugada a peroxidase. **C)** *Western blot* com anticorpo anti-RpfC, e **D)** e **E)** *Overlay* utilizando os domínios RpfCRR_{His415-613} e RpfCHpt_{His584-726}, respectivamente.

5.7. Análise de ligação de RpfC_{His173-726} em matriz de ATP-agarose

Para analisar a capacidade do domínio cinase de RpfC_{His173-} ligar a ATP, o polipeptídeo RpfC_{His173-726} foi expresso na cepa BL21D3 de *E. coli* e extraído dos corpos protéicos com o detergente sarcosil, e posteriormente dialisado contra tampão TBS. O experimento foi realizado na ausência ou presença de 1 mM dos íons divalentes Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ em TBS separadamente. Os ligantes foram eluídos da matriz de ATP-agarose com 20 mM de ATP em tampão TBS. RpfC_{His173-726} ligou a matriz de ATP-agarose em presença de Magnésio, Cálcio e Manganês, contudo não foi capaz de ligar na presença de Zinco (Figura 26). Adicionalmente, RpfC_{His173-726} somente foi eluída da matriz de ATP-agarose em presença de ATP, indicando que o ATP no tampão TBS estava competindo com a matriz de ATP-agarose. O tampão TBS sem ATP não foi capaz de eluir RpfC_{His173-726} ligado.

Figura 26. *Western blot* das amostras de RpfC_{His173-726} eluídas da matriz de ATP-agarose. **A)** Aproximadamente 30 µg de RpfC_{His173-726} incubados com 10 mg da matriz de ATP-agarose (Sigma) em tampão TBS **1)** sem íons divalentes, **2,3)** Magnésio, **4)** Cálcio, **5)** Manganês, **6)** Zinco, e eluídos com: **1,2,4,5,6)** 20 mM de ATP em tampão TBS ou **3)** somente tampão TBS. As amostras foram ressuspensas em tampão de corrida e resolvidas em gel SDS-PAGE 15%, transferidas para membrana de nitocelulose e incubadas com anticorpo anti-RpfC, seguida de proteína-A conjugada a peroxidase. Para revelação utilizou-se kit ECL da Amersham Biosciences.

5.8. Análise de modulação das interações entre proteínas do sistema Rpf e CMF por ATP

Depois de demonstrarmos a capacidade de RpfC_{His173-726} ligar a ATP, realizamos um experimento de *overlay* em placa de ELISA para verificar se a presença de ATP interfere nas interações entre RpfC_{His173-726} com RpfF, RpfG e CMF_{His100-655} (Fig. 27). A Tabela 7 mostra quais proteínas foram imobilizadas na placa de ELISA e as interações avaliadas nesse experimento. Confirmamos nesse ensaio as interações entre RpfF/RpfC_{His173-726}, RpfG/RpfC_{His173-726}, CMF_{His100-655}/RpfC_{His173-726}, e também entre RpfF/RpfCRR_{His415-613}, RpfG/RpfCRR_{His415-613}, CMF_{His100-655}/RpfCRR_{His415-613}, RpfG/RpfCHpt_{His584-726} e CMF_{His100-655}/RpfCHpt_{His584-726}, observadas nos ensaios de dois híbridos e *overlay*. Adicionalmente, observamos que a presença de ATP enfraquece a interação de RpfF e RpfG com RpfC_{His173-726}, enquanto a presença de ATP não afeta significativamente a ligação entre CMF_{His100-655} e RpfC_{His173-726} (Fig. 27).

Tabela 7. Interações proteína-proteína avaliadas em placa de ELISA apresentadas na Figura 27.

Controles e Interações analisadas	Proteína Imobilizada	Anticorpo utilizado
RpfC	RpfC _{His173-726}	α -RpfC _{His173-726}
RpfF	RpfF	α -RpfC _{His173-726}
FC	RpfF	α -RpfC _{His173-726}
FCATP	RpfF	α -RpfC _{His173-726}
FRR	RpfF	α -RpfC _{His173-726}
FHpt	RpfF	α -RpfC _{His173-726}
RpfG	RpfG	α -RpfC _{His173-726}
GC	RpfG	α -RpfC _{His173-726}
GCATP	RpfG	α -RpfC _{His173-726}
GRR	RpfG	α -RpfC _{His173-726}
GHpt	RpfG	α -RpfC _{His173-726}
CMF	CMF _{His100-655}	α -RpfC _{His173-726}
CMFC	CMF _{His100-655}	α -RpfC _{His173-726}
CMFCATP	CMF _{His100-655}	α -RpfC _{His173-726}
CMFRR	CMF _{His100-655}	α -RpfC _{His173-726}
CMFHpt	CMF _{His100-655}	α -RpfC _{His173-726}

G=RpfG, F=RpfF, C=RpfC_{His173-726}, RR= RpfCRR_{His415-613}, Hpt=RpfCHpt_{His584-726}, CMF= CMF_{His100-655}

Figura 27. Modulação das interações entre proteínas do sistema Rpf e CMF por ATP. 0.5 μ g de RpfC_{His173-726}, RpfF, RpfG e CMF_{His100-655}, respectivamente, foram imobilizadas em placas de ELISA, incubadas com anticorpo anti-RpfC, ou 0.5 μ g de RpfC_{His173-726}, ou RpfC_{His173-726}+2mM ATP, ou com os domínios RpfCRR₄₁₅₋₆₁₃ e RpfCHpt₅₈₄₋₇₂₆. Depois de repetidas lavagens o anticorpo anti-RpfC e proteína-A conjugada a peroxidase foram usados para detectar a ligação de RpfC_{His173-726}. As barras no gráfico indicam o desvio da média dos valores de três interações independentes quantificadas nesse experimento para cada interação analisada. A Tabela 7 descreve a proteína que foi imobilizada na placa de ELISA. As interações avaliadas foram:

- C, RpfC_{His173-726} incubada com anticorpo anti-RpfC;
- RpfF, RpfF incubada com anticorpo anti-RpfC;
- FC, interação RpfF/RpfC_{His173-726};
- FCATP, interação RpfF/RpfC_{His173-726} em presença de ATP;
- FRR, interação RpfF com o domínio RpfCRR_{His415-613};
- FHpt, interação RpfF com o domínio RpfCHpt₅₈₄₋₇₂₆;
- RpfG, RpfG incubada com anticorpo anti-RpfC;
- GC, interação RpfG/RpfC_{His173-726};
- GCATP, RpfG/RpfC_{His173-726} em presença de ATP;
- GRR, interação RpfG com o domínio RpfCRR_{His415-613};
- GHpt, interação RpfG com o domínio RpfCHpt_{His584-726};
- CMF, CMF_{His100-655} incubada com anticorpo anti-RpfC;
- CMFC, interação CMF_{His100-655}/RpfC_{His173-726};
- CMFCATP, interação CMF_{His100-655}/RpfC_{His173-726} em presença de ATP;
- CMFRR, interação CMF_{His100-655} com o domínio RpfCRR_{His415-613};
- CMFHpt, interação CMF_{His100-655} com o domínio RpfCHpt_{His584-726}.

5.9. O domínio HD-GYP de RpfG interage com domínios GGDEF e um ativador de Fator sigma 54 (NtrC) em ensaios de dois híbridos

Utilizando o domínio HD-GYP de RpfG (resíduos 190-379), clonado em pOBD, identificamos, por ensaio de dois híbridos, interações com proteínas que podem ser relevantes para o controle da virulência e adaptação de *Xac* a diversas condições do ambiente. A Tabela 8 mostra as interações observadas pelo ensaio de dois híbridos com RpfG_{HD-GYP(190-379)} atuando como isca. Nossos resultados de dois híbridos mostraram que o domínio HD-GYP de RpfG tem uma preferência em interagir com o domínio GGDEF de proteínas de *Xac*. Este resultado é inédito não havendo relatos das interações HD-GYP-GGDEF na literatura.

A proteína RpfG é ativadora da expressão dos genes da goma xantana, celulasas, pectinases e proteases por uma via desconhecida onde ela e RpfC são, até o momento, os únicos fatores atuantes. Não se conhece o mecanismo pelo qual RpfG, ativada pelo aumento da densidade celular em *Xanthomonas*, ocasiona mudanças na expressão desses genes relacionados com a virulência. Recentemente Ryan *et al.* (2006) demonstraram que o domínio HD-GYP atua como fosfodiesterase diminuindo a concentração do segundo mensageiro universal em bactérias, o cdiGMP. Desse modo o domínio HD-GYP atua de forma antagônica ao domínio GGDEF, o qual produz cdiGMP a partir de GTP respondendo a mudanças ambientais e ocasionando alterações no “pool” de RNA na célula por um mecanismo desconhecido (Romling *et al.*, 2005; Romling e Amikan, 2006). Em *Xac* existem 30 genes que codificam proteínas com o domínio GGDEF. Contudo, o domínio HD-GYP de RpfG interagiu somente com um grupo destas proteínas que se destacam pela ausência de domínios RR, PAS, GAF ou CHASE, que em geral regulam a sua funcionalidade, em resposta a presença de gases, nucleotídeos e fosforilação (Galperin *et al.*, 2001; Romling *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2001).

Uma outra interação que observamos foi entre o domínio HD-GYP e NtrC (XAC0208). A proteína NtrC é um ativador do fator sigma54, considerado um fator alternativo relacionado com a adaptação das células bacterianas a mudanças no ambiente e produção de flagelo (Studholme and Dixon, 2003). Adicionalmente, Alegria (2004) verificou por ensaio de dois híbridos duas interações entre RpfC e NtrB (XAC0207). NtrB/NtrC formam um sistema de dois componentes, sendo NtrB uma proteína constituída pelos domínios PAS (resíduos 10-112) e cinase (resíduos 122-340), e NtrC contendo os

domínios RR (resíduos 8-121), de ativação do fator sigma 54 (resíduos 146-367) e de ligação ao DNA (*helix-turn-helix*) (resíduos 431-471) (Hirschman et al., 1985; Kutsu et al., 1989). O domínio HD-GYP interagiu com um fragmento de NtrC contendo os domínios de ativação do fator sigma54 e de ligação ao DNA, enquanto RpfC interagiu com um fragmento de NtrB com o domínio HK intacto (ver Discussão).

Finalmente, devem ser mencionadas duas outras presas interessantes que interagiram com o domínio HD-GYP de RpfG nesse ensaio: A primeira presa, a proteína HmsF (XAC1812) (Tabela 8), cujo ortólogo em *Yersinia pestis*, presente no operon *hmsHFRS*, é importante na formação de biofilme, e conseqüentemente na virulência desse patógeno (Darby et al., 2002; Lillard et al., 1997). O operon *hmsHFRS*, em *Y. pestis*, está sob regulação das proteínas HmsT e HmsP, respectivamente, uma diguanilato ciclase (com domínio GGDEF) e fosfodiesterase (com domínio EAL) (Kirillina et al., 2004). Em adição, *Xac* possui um locus homólogo a *hmsHFRS* composto pelos genes XAC1813, XAC1812, XAC1811 e XAC1810, respectivamente, e pode ter função relevante na formação de biofilme em *Xanthomonas*.

A segunda presa, a proteína HPr cinase/fosfatase (ptsK) (XAC2975), cujos homólogos regulam o metabolismo de carbono e virulência em algumas bactérias (Deutscher et al., 2005), também interagiu com o domínio HD-GYP de RpfG (Tabela 8). Mehta e Rosato (2005) demonstraram que o gene XAC2975 tem sua expressão aumentada quando *Xac* é crescida em presença do seu hospedeiro, indicando que seu produto pode desempenhar uma função regulatória importante durante a patogenicidade.

Tabela 8 – Resumo das interações proteína-proteína observadas no sistema de dois híbridos utilizando RpfG_{HD-GYP (190-379)} como isca.

<u>Nome da isca</u> (resíduos na isca)	<u>Gene</u>	<u>Total de presas positivas</u> <u>seqüenciadas*</u>	<u>Identidade da presa</u> (Gene, Nome da proteína codificada (se aplicável): seguida pelo códon inicial das presas (Número de vezes observado))
RpfG (190-379) (domínio HD-GYP)	XAC1879	33	XAC0258: (GGDEF) 1(1), 53(1) XAC0424: (GGDEF) 245(1), 294(1), 300(1) XAC0593: (GGDEF) 270(1), 418(1) XAC0644: (GGDEF) 33(1), 36(1), 80(1), 134(1) XAC1420: (GGDEF) 18(1), 22(1), 98(1), 198(1), 203(1) XAC1486: (GGDEF) 13(1) XAC1939: (GGDEF) 682(1) XAC1940: (GGDEF) 362(1), 546(1), 612(1), 707(1) XAC2382: (GGDEF) 4(1) XAC0356: p-hidroxibenzoato hidroxilase: -26(1) XAC2369: geral proteína de estresse: 154(1) XAC2490: 60(1) XAC1595: ATP-NAD cinase: 230(1), 243(1) XAC1065: -2(1), -147(1) XAC0208: NtrC 134(1) XAC1812: HmsF 35(1) XAC2975: HPr cinase/fosfatase, 30(1)

* Não incluem presas falso-positivas da biblioteca identificadas por Alegria *et al.*, 2004.

(Tabela derivada de Andrade *et al.*, 2006)

5.10. Expressão diferencial dos genes *rpfG*, *rpfC*, *rpfF*, *rpfB*, *cmf* e *gumD* durante o crescimento de *Xac* em meio NA

Com intuito de verificar se os genes *rpfS*, *cmf* e *gumD* respondem ao aumento populacional de *Xac*, conforme demonstrado anteriormente para os genes *rpfF* e *rpfB* de *Xcc* (Barber *et al.*, 1997) e *Xylella fastidiosa* (Scarpari *et al.*, 2003), extraímos os RNA totais das culturas de *Xac* crescidas em meio NA nas DO_{600nm} 0.3, 0.5, 1.0 e 1.7 (Figura 28), e produzimos o DNA complementar (cDNA). A partir do cDNA, analisamos a mudança de expressão desses genes através de RT-PCR quantitativo em dois experimentos independentes. O gene *nuoA* (XAC2704), que codifica para subunidade NADH-ubiquinona oxirredutase (NQO7) da cadeia transportadora de elétrons, foi usado como gene controle para normalização dos valores experimentais. O fator de mudança para cada gene foi calculado com a base dois elevada ao valor negativo do produto da subtração dos valores obtidos para cada gene, depois da normalização, pelos valores da DO_{600nm} 0.3, de acordo

com o modelo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak *et. Al.*, 2001). Dessa forma, um gene foi considerado diferencialmente expresso, comparado com a DO_{600nm} 0.3, quando seu fator de mudança for maior que 2.

Os genes *rpfC*, *rpfF*, *rpfB* mostraram um aumento de expressão com o aumento da densidade celular, contudo o gene *rpfG* não alterou sua expressão nessas condições (Fig. 29). Adicionalmente, esse experimento demonstrou pela primeira vez que o gene *cmf* de *Xanthomonas* é expresso, e ainda tem sua expressão aumentada durante a fase estacionária, indicando que seu produto deve estar envolvido com processo de *quorum-sensing* nessa bactéria.

O produto do gene *gumD* (XAC2583) é a enzima glicosiltransferase que participa da primeira reação química envolvida na síntese de goma xantana (Chou *et al.*, 1997). Em adição, o sistema *rpf* ativa a produção de goma em *Xanthomonas*, dessa forma, como já era esperada, a expressão de *gumD* acompanhou o aumento da expressão dos genes *rpf*s (Figura 29).

Figura 28. Amostras de RNA totais extraídos de *Xac* em densidades ópticas de crescimento (DO_{600nm}) 0.3, 0.5, 1.0 e 1.7 respectivamente. Quantidade de 3 μ g de cada amostra foram resolvidos em gel de agarose 1% desnaturante.

Figura 29. Análise de RT-PCR quantitativo mostrando mudança da expressão dos genes *rpf*s, *cmf* e *gumD* em culturas de *Xac* crescidas em meio NA nas DO_{600nm} 0.5, 1.0 e 1.7 comparadas com a DO_{600nm} 0.3. O fator de mudança corresponde a valores das médias calculadas para cada gene em dois experimentos independentes. Para um gene ser considerado diferentemente expresso seu fator de mudança teve que ser alterado em duas unidades em relação à condição DO_{600nm} 0.3. Para análise dos dados utilizou-se a equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak *et. al.*, 2001). *rpfG*, XAC1877; *rpfC*, XAC1878; *rpfF*, XAC1879; *rpfB*, XAC1880; *cmf*, XAC0330; *gumD*, XAC2583.

5.11. Co-cultivo de *Dictyostelium discoideum* com *Xac*

Dictyostelium é uma ameba que vive na superfície de solos úmidos se alimentando de bactérias e leveduras (Eichinger *et al.*, 2005). Em laboratório ele é co-cultivado em geral com a bactéria *Klebsiella aerogenes*, da qual se alimenta. Em condições de carência nutricional suas células individuais se agregam formando um corpo de frutificação com esporos (Eichinger *et al.*, 2005). Um fator envolvido no acionamento desse comportamento agregativo em *Dictyostelium* é a proteína CMF, produzida e secretada por suas células durante a falta de nutrientes no meio. A proteína CMF secretada liga-se a receptores específicos chamados CMFR1 e CMFR2 ativando uma cascata de sinais que promovem a liberação de cAMP para meio, que funciona como quimioatrativo para suas células (Deery *et al.*, 2002).

Linhagens de células selvagens *D. discoideum* DH1 e mutantes DH1*cmf*⁻ (Jain e Gomer, 1994) foram co-cultivadas com *K. aerogenes* ou *Xac* em condições previamente descritas em Materiais e Métodos seção 2.14. A linhagem *D. discoideum* DH1 durante condições de carência nutricional formou corpos de frutificação tanto quando crescida com *K. aerogenes* ou *Xac* (Figura 15). O mutante DH1*cmf*⁻ não formou corpos de frutificação quando crescido em presença de *K. aerogenes* ou *Xac* (Figura 30). Portanto, não foi observado crescimento diferencial nem fenótipo alternativo para as linhagens de *D. discoideum* selvagem e mutante crescidas com *K. aerogenes* ou *Xac*.

Figura 30. Co-cultivo das linhagens selvagem DH1 e mutante DH1 cmf^- de *D. discoideum* com *K. aerogenes* e *Xac*. **A)** e **B)** linhagem selvagem DH1 de *D. discoideum* crescida com *K. aerogenes* e *Xac* respectivamente. **C)** e **D)** linhagem mutante DH1 cmf^- de *D. discoideum* crescida com *K. aerogenes* e *Xac* respectivamente. A) e B) aumento de 3X; C) e D) aumento de 22X.

5.12. Produção dos mutantes do nocaute em *cmf* de *Xac* e ensaio de crescimento das cepas selvagem e mutante nos meios NA e NYGB

Os nocautes do gene *cmf* de *Xac* obtidos com inserção do transposon *EZ-Tn5<kan-2>* (Epicentre) foram confirmados por PCR, sequenciamento e *Southern blot* (Figura 31). Primeiramente os nocautes foram analisados por PCR para verificar a presença de uma única cópia do gene *cmf* com o inserto de 1200 pb do transposon (Fig. 31A), e posteriormente isso foi confirmado por *Southern blot* (Fig. 31B). O sequenciamento da construção *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* permitiu determinar a posição (1086) onde o transposon *EZ-Tn5<Kan-2>* foi inserido no gene *cmf* (Fig. 31C e 31D).

Diferenças fenotípicas foram verificadas quando as cepas selvagem e mutante foram crescidas nos meios de cultura NA e NYGB, meios geralmente utilizados para crescer *Xac* em laboratório. Observamos que os mutantes crescem mais lentamente em meio NA e NYGB quando comparamos com o selvagem (Fig. 32).

Figura 31. A) PCR de colônias individuais de *Xac* crescidas em meio LB com 50 µg de kanamicina depois de serem eletroporadas com a construção do transposon *EZ-Tn5<Kan-2>* inserido no gene *cmf*. Nas colônias com o gene *cmf* nocauteado, o fragmento amplificado com oligonucleotídeos específicos para gene *cmf*, apresenta um tamanho de 1200 pb maior que o selvagem. Circulo vermelho destaca os fragmentos amplificados com *cmf* nocauteado; A seta azul indica o fragmento amplificado para *cmf* não nocauteado. **B)** *Southern blot* de duas colônias com o gene *cmf* nocauteado. O DNA genômico das colônias mutantes 6 e 19, e selvagem foram extraídos, e 8 µg de DNA para cada amostra foram digeridos com a enzima *Pst*I por 12 h, resolvidos em gel de agarose 1% e transferidos para membrana de nylon. 1 µg do fragmento de 600 pb da região 3' do gene *cmf* foi marcado com fluoresceína usando kit Fluorescein ULS labeling (Fermentas) e usado como sonda. **C)** Sequenciamento do gene *cmf* nocauteado com o transposon *EZ-Tn5<Kan-2>* (Epicentre) usando o oligo KAN-RP-1 (Epicentre). A seta indica o nucleotídeo 1086 do gene *cmf* onde o transposon foi inserido, interrompendo o gene. **D)** Esquema representando o local de inserção do transposon *EZ-Tn5<Kan-2>* no gene *cmf*, e os sítios da enzima de restrição *Pst*I.

Figura 32. Fenótipos diferenciados das cepas selvagem e mutante *cmf::kan* observados nos meios de culturas onde *Xac* foi crescida. Os mutantes (4, 6 e 19) crescem lentamente nos meios NA e NYGB quando comparados com o tipo selvagem (WT), não havendo diferença quando crescidos no meio L. **A)** Meio NA **B)** Meio NYGB e L **C)** Meios LB e MA sólidos. WT, cepa selvagem de *Xac* (306); 4, 6 e 19, cepas isoladas independentemente de *Xac cmf::Tn<kan>*.

5.13. Ensaio de formação de Biofilme e análise da estrutura macroscópica das colônias formadas por cepas selvagem e mutante para *cmf* em *Xac*

A formação de biofilme e adicionalmente as morfologias apresentadas pelas colônias de microrganismos em algumas bactérias estão sob controle do processo de *quorum-sensing* (Zogaj *et al.*, 2001; Prouty *et al.*, 2002; Parsek e Greenberg, 2004). Dessa forma, tivemos interesse em verificar o comportamento das cepas selvagem e mutante quanto à formação de biofilme e morfologia macroscópica de suas colônias. Interessantemente, observamos que as cepas com gene *cmf* nocauteado não formam biofilme quando crescidas em tubos de ensaio de vidro no meio L com temperatura controlada a 30 °C, e sob uma agitação de 200 rpm durante 48 h (Figura 33).

Figura 33. Ensaio para verificar a formação de biofilme em tubos de ensaio de vidro para cepas selvagem e mutante de *Xac*. As cepas selvagens (WT) e mutantes independentes *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* (*cmf-1* e *cmf-2*) foram crescidas a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm durante 48 h. Os tubos foram corados com cristal violeta 0.1%.

Estudos de biofilme formados por *Salmonella spp* (Zogaj *et al.*, 2001; Solano *et al.*, 2002; Simm *et al.*, 2004; Kader *et al.*, 2006) mostram que o polissacarídeo celulose e as fímbrias desempenham papéis primordiais na sua formação. O aumento da produção e acúmulo de celulose condiciona uma morfologia rugosa na colônia de *Salmonella* (Solano *et al.*, 2002; Kader *et al.*, 2006). As cepas de *Xac* selvagem e mutante para o gene *cmf* foram crescidas em meio L sólido para verificar a morfologia macroscópica das colônias. A colônia formada pela cepa selvagem apresenta estruturas agregadas internas, os quais não são observados nas cepas de *Xac* com o gene *cmf* nocauteado (Figura 34)

Figura 34. Análise da morfologia das colônias de cepas selvagem (WT) e mutantes *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* (*cmf-1* e *cmf-2*) de *Xac* crescidas a 30 °C em meio LB+0.5% agar+0.5% glicose por 48 h.

5.14. Análise da produção de goma xantana nas cepas selvagem e mutante *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* *in vivo*

Durante a realização dos experimentos, notamos que as culturas de células mutantes crescidas *overnight* pareciam ser mais viscosas que as selvagens. Dessa forma, pensamos que as cepas mutantes poderiam estar produzindo maior quantidade de EPS (exopolissacarídeo), principalmente goma xantana, quando comparadas com as células selvagens. Para confirmar nossa hipótese, quantificamos a produção de goma xantana das cepas selvagem e mutante crescidas em meio L, a 30 °C, 200 rpm por 16 horas, em duplicada.

De fato, demonstramos que as células mutantes *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* produzem aproximadamente 3.5 vezes mais goma xantana que as células de *Xac* (306) selvagens, crescidas nas mesmas condições (Figura 35). Esse experimento também confirmou que células de *Xcc*, que produzem entre 3-6 g de goma xantana/L de cultura, são realmente os maiores produtores de EPS no gênero *Xanthomonas* (Vojnov *et al.*, 1998).

Figura 35. Produção de EPS por células de *Xac* selvagens e mutantes. A produção de EPS *in vivo* para cepas selvagens e mutantes *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* (*cmf-1* e *cmf-2*) foi determinada gravimetricamente depois de sua precipitação com etanol do sobrenadante do meio de cultura com DO_{600nm} de 3.0, seguido de secagem e pesagem. Os valores foram expressos em relação ao volume do meio de cultura.

5.15. Ensaio de patogenicidade do mutante *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* em plantas de *Citrus spp*

Células de *Xac* infectam as folhas de citros levando ao aparecimento de sintomas iniciais do cancro cítrico, *water soaking* e hiperplasia, os quais evoluem para o processo infeccioso tardio característico do cancro cítrico (lesão amarela ferrugem no local do inóculo). Desse modo, a capacidade das células selvagem e mutante *cmf::EZ-Tn5<kan-2>* de induzirem os sintomas do cancro cítrico foi avaliada através da inoculação das células em folhas jovens de citros (laranja Doce e limão Cravo). Os resultados desse experimento são mostrados na Figura 36. Após seis dias da inoculação as cepas selvagens e mutantes de *Xac* apresentaram fenótipos característicos de *water soaking* (acúmulo de líquido próximo ao local da inoculação), no entanto somente as plantas inoculadas com as células selvagens apresentaram hiperplasia nesse estágio da infecção (Fig. 36). Esses resultados indicam que CMF participa no mecanismo de patogenicidade de *Xac*, atuando no estágio inicial do cancro cítrico, especificamente ajudando a ocasionar o aumento das células no tecido infectado. Esses resultados, serão melhores abordados na Discussão.

Figura 36. Capacidade das células selvagens e mutantes de *Xac* induzirem os sintomas iniciais do cancro cítrico em folhas jovens de laranja Doce e limão Cravo. A) e C) folhas jovens de laranja e limão, respectivamente, após 3 dias de inoculação. B) e D) folhas jovens de laranja e limão, respectivamente, após 6 dias de inoculação. wt1 e wt2, cepas selvagens de *Xac* (306); Mut1, Mut2 e Mut3 cepas mutantes *cmf::EZ-Tn5<kan-2>*.

Discussão

6. Discussão

O processo de quorum-sensing em *Xanthomonas* regula a síntese e secreção de enzimas extracelulares (proteases, endoglucanases e pectinases) e polissacarídeos extracelulares importantes para patogenicidade da bactéria (Dow e Daniels, 1994; Chan e Goodwing, 1999). O aumento observado da produção de enzimas extracelulares quando *Xcc* atinge a fase estacionária de crescimento e durante o processo de infecção está sob controle do grupo de genes denominado *rpf* (“regulation of pathogenicity factors”) (Tang *et al.*, 1991; Barber *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1998; Dow *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2000). O locus *rpf* em *Xac* e *Xcc* é formado por sete e nove genes respectivamente, nomeados de *rpfA-I* (o genoma de *Xac* perdeu os *rpfH* e *rpfI*) (Figura 5 na seção 1). Baseando-se em uma série de experimentos para estudar fenótipos como produção de DSF, EPS e enzimas extracelulares de mutantes polares e apolares para genes *rpf* específicos, Slater *et al.*, (2000) propôs um modelo representando o mecanismo de sinalização durante o *quorum-sensing* em *Xanthomonas* (Figura 7 na seção 1).

Nós demonstramos por ensaios de dois híbridos e ensaios *in vitro* (Andrade *et al.*, 2006) fortes evidências para uma série de interações inéditas proteína-proteína que ampliam a complexidade da via de transdução de sinal do quorum-sensing in *Xanthomonas* até então com apenas dois “atores” RpfC-RpfG, revelando mecanismos que podem exercer importante controle sobre a expressão dos fatores de patogenicidade. Esses resultados revelam cinco importantes interações: i) a interação direta entre RpfC e RpfF, ii) a interação direta entre RpfC e RpfG iii) interações entre o domínio HD-GYP da RpfG e um grupo de proteínas com o domínio diguanilato ciclase (GGDEF), iv) interações entre o sistema de dois componentes RpfCG e o sistema de dois componentes NtrBC, e v) a interação entre RpfC e CMF (Figura 37; Figura 38). Adicionalmente nos verificamos a capacidade de RpfC₁₇₃₋₇₂₆ ligar a ATP-agarose, estudamos a modulação por ATP das interações entre RpfC₁₇₃₋₇₂₆/RpfF, RpfC₁₇₃₋₇₂₆/RpfG e RpfC₁₇₃₋₇₂₆/CMF₁₀₀₋₆₅₅ (Fig.37). Finalmente, analisamos uma possível função de CMF em *Xac*, confirmando sua expressão numa maneira dependente da densidade celular, e empregando experimentos com o mutante *cmf*⁻ de *Xac*.

Interações proteína-proteína envolvendo o sistema de dois componentes RpfCG

6.1. Interação direta entre RpfC e RpfF

O produto do gene *rpfF* é uma enoil-CoA hidratase necessária para produção do DSF (Barder et al., 1997). Proteínas desta família catalisam a seguinte reação reversível $\text{<(3S)-3-hydroxyacyl-CoA = trans-2(ou 3)-enoyl-CoA + H}_2\text{O>}$ (EC 4.2.1.17). Essa reação é aparentemente relacionada à síntese do auto-indutor de *quorum-sensing* em *Xanthomonas*, o DSF, um ácido graxo α - β -insaturado. Nossos ensaios demonstrando uma interação direta entre RpfF e o domínio RR de RpfC sugerem que essa interação pode modular sua atividade. Assumindo que sob condições dos ensaios de dois híbridos e *overlay* os fragmentos derivados de RpfC não estavam fosforilados, podemos especular que RpfF pode ligar na forma RpfC não fosforilada. Em adição, o experimento de modulação por ATP das interações em placa de ELISA mostrou uma diminuição da ligação de RpfC a RpfF na presença de ATP. A interação RpfC/RpfF pode funcionar como um mecanismo de *feedback* para regular positivamente ou negativamente a atividade enzimática de RpfF em função da ligação de DSF a RpfC durante o *quorum-sensing* (Fig. 37). No sistema de *quorum-sensing* LuxIR de *Vibrio fischeri*, a produção do auto-indutor é aumentada em condições de alta densidade celular devido ao feedback positivo controlado pela ligação do auto-indutor a LuxR (revisado por Whitehead *et al.*, 2001; Waters e Bassler, 2005). Finalmente, a atividade de RpfF pode ser regulada pela ligação de outras proteínas a RpfC como CMF, RpfG ou NtrB (Fig. 38).

6.2. Interação direta entre RpfC e RpfG

Interações proteína-proteína modulando o estado de fosforilação dos seus domínios são a base funcional das vias de sinalização formadas por sistemas de dois componentes. Nossos ensaios demonstraram pela primeira vez uma interação direta entre os domínios RR e Hpt de RpfC com RpfG, não sendo necessário, portanto, o domínio HK de RpfC. Esses resultados evidenciam a funcionalidade desse sistema de dois componentes regulando o processo de *quorum-sensing* em *Xanthomonas*. Em sistemas de dois componentes similares a RpfCG, a transferência do grupo fosfato foi demonstrada ocorrer principalmente do domínio Hpt da proteína receptora de sinal para o domínio RR da proteína efetora, ou vice-versa dependendo da presença ou ausência da molécula sinal (Kwon *et al.*, 2000; Peña-

Sandoval *et al.*, 2005). A interação vista entre o domínio RR de RpfC e RpfG pode ser uma forma de regular a atividade de outras proteínas que se ligam a RpfC como RpfF, CMF ou NtrB (Fig. 38)

A interação vista entre o sistema de dois componentes RpfCG parece ser diminuída em presença de ATP, conforme esperado em condições de alta densidade celular quando ocorre aumento de DSF no meio e RpfC deve se autofosforilar e transferir o fosfato para o domínio RR de RpfG, ativando seu domínio efetor (Fig. 37) (Slater *et al.*, 2000; revisado por Crossman e Dow, 2004).

6.3. Interações entre o domínio HD-GYP de RpfG com um grupo de proteínas de Xac com domínio de diguanilato ciclase (GGDEF)

Os eventos moleculares controlados pelo sistema de dois componentes RpfCG, que levam a ativação da expressão dos fatores de virulência durante o quorum-sensing em *Xanthomonas*, ainda são desconhecidos. Contudo acredita-se que o domínio efetor HD-GYP de RpfG desempenhe um papel importante na regulação da expressão desses fatores (Slater *et al.*, 2000; revisado por Crossman e Dow, 2004; Ryan *et al.*, 2006).

O domínio HD-GYP pertence à superfamília HD de metal hidrolases (Aravind e Koonin, 1998; Galperin *et al.*, 1999, 2001) e são comumente encontradas fusionadas a outros domínios de sinalização celular como RR, GGDEF, FliY e PER (Galperin *et al.*, 2001; Galperin, 2004). Essas observações contribuíram para Galperin *et al.*, (2001) proporem que o domínio HD-GYP poderia funcionar como uma fosfodiesterase atuando na desfosforilação de outras proteínas ou na hidrólise de nucleotídeos cíclicos, especialmente *bis*-3'→5' diGMP cíclico (c-diGMP). De fato, durante a escrita dessa dissertação Ryan *et al.*, (2006) confirmou que o domínio HD-GYP de RpfG exibe atividade de fosfodiesterase hidrolisando de modo específico o c-diGMP.

A molécula de c-diGMP é um segundo mensageiro universalmente encontrado em bactérias cujas concentrações celulares são reguladas opostamente pela ação de diguanilato ciclases (GGDEF) e fosfodiesterases (EAL e HD-GYP) (Jenal, 2004; Römling *et al.*, 2005; Römling and Amikam, 2006; Ryan *et al.*, 2006). Recentemente c-diGMP emergiu como regulador de muitos processos celulares importantes e complexos em bactéria como mobilidade (Simm *et al.*, 2004), virulência (Hisert *et al.*, 2005), morfologia (Paul *et al.*, 2004), e produção de biofilme (Tischler e Camilli, 2004). Devido a muitos

desses processos também serem regulados por *quorum-sensing*, foi proposto que deve existir uma relação direta (“link”) entre quorum-sensing e a sinalização por c-diGMP (Camilli and Bassler, 2006). Nesta tese nos identificamos uma ligação física direta entre o sistema de dois componentes RpfCG, que controlam o mecanismo de resposta do quorum-sensing, e a via de sinalização de c-diGMP em *Xanthomonas*. Esta ligação é realizada através de interações observadas entre o domínio HD-GYP de RpfG e o grupo de proteínas com domínio GGDEF codificadas pelo genoma de *Xac* (Andrade *et al.*, 2006). Nossos resultados complementam aqueles publicados por Ryan *et al.*, (2006) que recentemente demonstraram a atividade de fosfodiesterase do domínio HD-GYP de RpfG, especificamente para c-diGMP.

O genoma de *Xac* codifica trinta proteínas com domínio GGDEF. A variedade de domínios presentes nas arquiteturas dessas proteínas é mostrada na Figura 39. Enquanto várias dessas proteínas só apresentam o domínio GGDEF (XAC0614, 0424, 1420, 1486, 2897), a maioria possuem domínios adicionais envolvidos com transdução de sinais em bactérias: β -propeller, YYY, cyclic nucleotide binding, HAMP, PAS, GAF, CHASE, MHYT, repetições “tetratricopeptide”, RR e EAL (Fig. 39). Contudo, das 30 proteínas, somente nove interagiram com o domínio RpfG HD-GYP nesse estudo (Tabela 8 seção 3). Não podemos afirmar ainda se esse número de proteínas com domínio GGDEF que interagiram com o domínio RpfG HD-GYP está coerente com o que ocorre nos diferentes estados fisiológicos da célula, ou superestimado ou subestimado. Interessantemente, essas nove proteínas têm algumas características em comum que as diferenciam das outras. Primeiramente, nenhuma das nove proteínas possui os domínios RR, PAC ou GAF (note que 15 das 30 proteínas com domínio GGDEF têm pelo menos um desses domínios, Fig. 39). Em outras proteínas onde os domínios PAS e GAF foram caracterizados eles funcionam como sensores do meio frequentemente ligando a grupo heme, co-fatores derivados de flavina, fotopigmentos ou nucleotídeos e são sensíveis a fatores como a luz, potencial redox, oxigênio, e outros pequenos ligantes (Aravind e Ponting, 1997; Taylor e Zhulin, 1999). A não interação de RpfG com essas proteínas pode estar revelando de como o fluxo de informação é direcionado nesse sistema. A ligação de moléculas sinais nos domínios sensores de RpfC e/ou NtrB pode ser o principal sinal que regula a produção de c-diGMP pelo grupo de proteínas GGDEF que interagiram com o domínio RpfG HD-GYP

(Figura 38). Segundo, somente uma das proteínas GGDEF que interagiram com o domínio HD-GYP de RpfG tem o domínio EAL. Similar ao domínio HD-GYP, o domínio EAL também funciona como uma fosfodiesterase, hidrolisando c-diGMP. Dessa forma, era esperado que proteínas que possuem os dois domínios GGDEF e EAL fusionados não interagiriam com HD-GYP. Terceiro, as seqüências dos domínios GGDEF em todas as nove proteínas são muito coerentes com o consenso funcional do domínio como mostrado na Figura 40. Por outro lado, muitas das proteínas GGDEF que não interagiram, principalmente aquelas na metade de baixo da Figura 39, apresentam substituições de resíduos altamente conservados na forma consenso funcional (Fig. 40). Por exemplo, o motivo RXGGD/EEF é quase perfeitamente conservado em todas as nove proteínas com domínio GGDEF que interagiram com RpfG (somente 2 substituições) mas tem uma taxa de mutação significativa (26 substituições em 18 proteínas) nas proteínas que contêm domínios PAS, GAF, RR ou EAL. As taxas de substituições são altas especialmente nas proteínas GGDEF que também possuem o domínio EAL fusionado (18 substituições em 10 proteínas) (Fig. 40). Finalmente, nos observamos que metade das proteínas com domínio GGDEF de *Xac* têm um suposto domínio transmembrana, sendo esse o caso de seis das nove proteínas que interagiram com RpfG (Figura 39).

O mecanismo pelo qual o c-diGMP controla processos celulares específicos não é bem conhecido. Nós só conhecemos um pouco do seu alvo imediato na célula bacteriana. A ativação alostérica da celulose sintase por ligação de c-diGMP no seu domínio PilZ foi o primeiro, e se mantém até os dias atuais como o único, alvo específico conhecido do c-diGMP (Amikam and Galperin, 2005). Esse domínio tem sido identificado em proteínas com função desconhecida ou na celulose sintase de muitos genomas bacterianos seqüenciados. No genoma de *Xac* são codificadas quatro proteínas com o domínio PilZ XAC318, XAC1135, XAC1971 e XAC3402 (Amikan e Galperin, 2005). Um alinhamento dos resíduos de aminoácidos que compõem essas proteínas é apresentado na Figura 41.

Trabalhos recentes sugerem que a concentração de c-diGMP na célula bacteriana é regulada de maneira temporal e localizada, com alterações discretas em microambientes na célula, o que aumenta a importância das observações de interações proteína-proteína regulando os processos celulares envolvendo esse segundo mensageiro (Paul *et al.*, 2004; Romling *et al.*, 2005; Hisert *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2005). Desse modo, a interação

física que observamos entre os domínios HD-GYP e GGDEF adiciona novas dimensões de complexidade possíveis para entender a função catalítica dessas proteínas como mostrado na Figura 42: i) a interação HDGYP-GGDEF pode regular a atividade de fosfodiesterase e diguanilato ciclase dos respectivos domínios, ii) a interação pode ser regulada pela fosforilação do domínio RR de RpfG, iii) a atividade de fosfodiesterase de HD-GYP pode ser regulada pela fosforilação do domínio RR de RpfG ou, iv) pela associação de RpfG com outras proteínas e v) a interação pode facilitar a transferência do c-diGMP do domínio GGDEF para o HD-GYP, dessa forma evitando a difusão do c-diGMP do sítio de síntese. Parece consistente que a atividade desses dois domínios sejam reguladas reciprocamente de forma a evitar a existência de um ciclo fútil de síntese e hidrólise imediata de c-diGMP na célula. Isso pode ser confirmado se a associação desses domínios exibisse somente a atividade de um dos domínios devido à mudança conformacional ou impedimento estérico de um dos sítios catalíticos. De outra forma, isso pode ocorrer se a fosforilação de RpfG regula ao mesmo tempo sua atividade de fosfodiesterase e sua afinidade pelo domínio GGDEF. Finalmente, a ligação de outras proteínas a RpfG, por exemplo RpfC ao domínio RR ou NtrC ao domínio HD-GYP, pode regular sua atividade e ao mesmo tempo modular sua afinidade pelos domínios GGDEF (Fig. 42). Todas essas possibilidades precisarão ser testadas experimentalmente no futuro.

6.4. Interações entre o sistema de dois componentes RpfCG e o complexo NtrBC-sigma54

A interação física entre os domínios HD-GYP e GGDEF implica que o fluxo de informação do sinal de transdução pode a princípio seguir os dois caminhos: a ligação do domínio HD-GYP ao GGDEF pode controlar as concentrações de c-diGMP, ou a ligação de c-diGMP a domínios GGDEF (ativos ou inativos) ou ao HD-GYP, podendo controlar outras funções de RpfG (domínios GGDEF inativos ocorrem devido à substituição de resíduos importantes no sítio ativo; Fig. 40. Ver seção 6.3 e Romling *et al.*, 2005). Neste trabalho nós observamos interações entre o domínio RpfG HD-GYP e o domínio ativador do fator Sigma54 de NtrC (XAC0208). Além disso, na sua tese de doutorado, Marcos Alegria observou uma interação entre a proteína RpfC com o domínio HK de NtrB (XAC0207). Adicionalmente Maria Cláudia Pereda Rosa detectou uma interação entre

NtrC/XAC0208 e o fator sigma54 (XAC2974) (Figura 38; Andrade *et al.*, 2006). Essas observações sugerem que os diversos sinais “input” detectados pelos domínios sensores de RpfC, proteínas com o domínio GGDEF e NtrB podem ser integrados, processados e convertidos em sinais “output” na forma de c-diGMP ou atividade promotora do fator Sigma54 (Fig. 38). Os sinais “input” de RpfC podem ser DSF e/ou CMF. Contudo uma ligação direta de DSF a RpfC ainda não foi demonstrada. Além disso, estudos recentes têm demonstrado o envolvimento de homólogos de NtrC com domínio ativador de Sigma54 (LuxO) nos processos de *quorum-sensing* de *Vibrio harveyi* and *V. cholerae* (Lenz *et al.*, 2004).

6.5. Interações entre RpfC e CMF

A interação da proteína sensora do *quorum-sensing* em *Xac* (RpfC) com o homólogo da proteína difusível no *quorum-sensing* do *D. discoideum* é intrigante. O *D. discoideum* se alimenta de bactérias presentes no solo quando na forma unicelular amebóide. Contudo, sob condições de carência nutricional, as células param de se dividir, e em resposta à liberação de pulsos de AMP cíclico (cAMP), agregam-se para formar colônias, as quais sofrem uma série de mudanças morfológicas para eventualmente formarem corpos de frutificação suspensos por um talo fino. O processo inicial de liberação de cAMP e agregação é dependente da secreção e acúmulo da glicoproteína de 80 kDa CMF (“conditioned medium factor”) (Jain *et al.*, 1992). No *D. discoideum*, CMF e cAMP parecem ter grande afinidade pelos seus respectivos receptores acoplados a proteína-G e quando ligados induzem a produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), cAMP e cGMP e a liberação de Ca^{2+} no citoplasma (Van Haastert *et al.*, 1996; Deery and Gomer, 1999; Deery *et al.*, 2002). CMF também liga a CMFR1, um receptor não acoplado a proteína-G que controla, num processo dependente de cAMP, a expressão de genes relacionados com as características iniciais do desenvolvimento incluindo pré-talo e pré-esporo (Brazill *et al.*, 1998; Deery *et al.*, 2002).

A função do homólogo de CMF em *Xanthomonas* não é conhecida. Uma hipótese é que a proteína CMF pode atuar como molécula sinalizadora para o *quorum-sensing* em *Xanthomonas*. De fato, experimentos mostram que DSF não é o único fator determinante da síntese de enzimas extracelulares e EPS (Poplawsky *et al.*, 1998; Slater *et al.*, 2000). O alinhamento das seqüências de aminoácidos do CMF de *Xanthomonas spp* e *D. discoideum*

(Figura 7 seção 1) revelou uma similaridade de sequência significativa entre essas proteínas CMF, incluindo uma possível sequência sinal (sublinhada e em negrito, Figura 8 na Introdução) (Fekkes and Driessen, 1999). Isso sugere que a proteína CMF de *Xanthomonas* pode estar associada à membrana interna ou ser secretada para o periplasma.

Outra hipótese seria que o CMF secretado de *Xanthomonas* pode de certa maneira fazer com que amebas que se alimentam de bactéria no solo como o *D. discoideum* parem de se alimentar, condicionando um estado de carência nutricional e dessa forma ativando prematuramente o desenvolvimento multicelular, ou pelo menos iniciar uma diferenciação. De fato, formas epifíticas de *Xanthomonas spp* sobre tecidos vegetais podem cair no solo e dessa forma encontrar predadores amebóides como *D. discoideum*. Nós observamos, que sequências parciais do cDNA de dois homólogos de CMF foram recentemente depositadas num banco de dados público, ambas de amebas unicelulares, *Hartmannella vermiformis* (AY923750) e *Acanthamoeba castellanii* (AY923751), indicando que a via de sinalização de quorum-sensing ativada por CMF provavelmente não é restrita a *Dictyostelium*. Em adição, *Xanthomonas* pode estar sob forte pressão natural no ambiente para se defender contra predadores, e a aquisição do gene *cmf* via transferência horizontal pode ter sido vantajoso por conferir um mecanismo de interferência no *quorum-sensing* do predador.

As duas hipóteses mencionadas acima para a função de CMF como auto-indutor intraespecífico ou interespecífico requerem a secreção de CMF. Contudo, nós observamos interações de CMF com os domínios citossólicos RR e Hpt de RpfC. Interações de CMF com RpfC pode estar modulando sua interação com outras proteínas, incluindo RpfF, RpfG e NtrB, desse modo contribuindo para a regulação do *quorum-sensing* de uma maneira complexa (Fig 37; Fig. 38). Em adição, experimentos de co-cultivo de *D. discoideum*, linhagem DH1 selvagem e DH1*cmf*⁻ mutante, com *Xac* e *K. aerogenes* mostraram o mesmo fenótipo de crescimento e desenvolvimento tanto para linhagem DH1 selvagem quanto para mutante. Desse modo, o co-cultivo do mutante de *Dictyostelium* DH1*cmf*⁻ com *Xac* não foi capaz de reverter seu fenótipo complementando a deleção do gene *cmf* nessa linhagem. Contudo não sabemos se CMF de *Xac* foi expresso nas condições utilizadas no experimento e ainda se de fato CMF de *Xac* é secretado. Nenhuma das hipóteses colocadas acima para atuação de CMF de *Xac* são mutuamente exclusivas e serão testadas individualmente no futuro.

Experimentos realizados em placa de ELISA para confirmar interações vista em outros ensaios e verificar a modulação por ATP de interações entre elas CMF_{His100-655}/RpfC_{His173-726} não mostrou uma diferença significativa na presença de ATP. No entanto, observamos uma preferência de CMF ligar ao domínio RR de RpfC, indicando que CMF pode estar competindo com RpfF por esse domínio durante o quorum-sensing em *Xac* (Fig. 37 e Fig. 38).

Análise da expressão gênica durante o processo de quorum-sensing em Xac

6.6. Os genes *rpf*, com exceção de *rpfG*, e *cmf* apresentam uma expressão diferencial e aumentada durante o quorum-sensing em *Xac*

Bactérias podem coordenar a sua expressão gênica em resposta a concentrações do auto-indutor durante o processo de quorum-sensing (Waters e Bassler, 2005). De fato, inúmeros processos fisiológicos relevantes para colonização do hospedeiro são governados pelo sistema regulatório do *quorum-sensing* em bactérias (Davies *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Withers *et al.*, 2001; Minogue *et al.*, 2005). Dessa forma, reguladores de transcrição que atuam durante o aumento da densidade celular têm sido identificados em várias bactérias, entre eles, homólogos de LuxR, uma proteína com domínio de ligação ao auto-indutor e outro de ligação ao DNA, e LuxO, um ativador de sigma54, da família de NtrC. Geralmente esses diferentes reguladores de transcrição se fazem presentes numa mesma bactéria respondendo a distintos auto-indutores e regulando a expressão de diferentes genes (Waters e Bassler, 2005). No entanto, em *Xanthomonas* ainda não foi identificado nenhum fator de transcrição que responde ao aumento populacional, desse modo regulando a expressão de enzimas extracelulares e EPS. Em bactérias entéricas e em *Pseudomonas spp* a regulação da expressão dos genes durante a fase estacionária é realizada pelo fator sigma38 (RpoS) (Wosten, 1998), um subgrupo dos fatores sigma70. Entretanto, um gene codificando um fator sigma38 não foi identificado na anotação do genoma de *Xac* (da Silva *et al.*, 2002).

Um trabalho realizado por Crecy-Lagard *et al.*, (1990) identificou, através de cepas mutantes de *Xcc*, um gene, cujo homólogo em *Xac* é nomeado XAC0483, que codifica um fator de transcrição global Clp (*cyclic AMP receptor protein-like protein*), que regula

positivamente, em parte, a produção de goma xantana, enzimas extracelulares, pigmentação e fimbrias tipo IV. Contudo, somente foi demonstrada a ligação do homólogo de XAC0483 no promotor do gene *engA* de *Xcc* (que codifica a principal celulase secretada), e sua regulação positiva, sem a ligação direta, no promotor do gene *prtA* (protease secretada). Adicionalmente, a ativação de XAC0483 durante a fase estacionária, e sua ligação no promotor do operon *gum*, ainda não foram demonstrados experimentalmente (Lee *et al.*, 2001; Hsiao e Tseng, 2002; Hsiao *et al.*, 2005).

Nossos resultados de qRT-PCR confirmam os resultados previamente descritos na literatura por Barber *et al.*, (1997) e Slater *et al.*, (2000) para o aumento da expressão dos genes *rpfF* e *rpfB*, e conseqüentemente do operon *gum* em *Xanthomonas* como resposta ao aumento da densidade celular no meio. Em adição observamos pela primeira vez que a expressão do gene *rpfG* não é alterada, e o gene *cmf* tem também sua expressão aumentada em função do *quorum-sensing* em *Xac*.

A análise comparativa usando o proGrama ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) das supostas seqüências promotoras dos genes *rpfC* e *rpfF*, e *cmf* e do operon *gum*, cuja expressão foram aumentadas durante a fase estacionária, nos permitiu identificar duas possíveis seqüências regulatórias que poderiam ser sítios de ligação de dois fatores de transcrição distintos e ainda não conhecidos. A primeira seqüência 5'GTGTT/CCGA/GCG/ACGCT/CGCT/CGT/GC/AG 3' foi encontrada nos promotores dos genes *rpfC* e *rpfF*, nas posições 195 e 182 “upstream” da adenina dos respectivos primeiros códons (ATG). A segunda seqüência consenso observada 5'CGG/CTGCGATTT/CTTCTG/CTGCGA 3' esta presente nos promotores dos genes do operon *gum* e o gene *cmf*, respectivamente, nas posições 220 e 206 “upstream” do primeiro códon (ATG) dos respectivos genes. Interessantemente, no locus *rpf* existem dois genes XAC1883 e XAC1884 codificando proteínas conservadas hipotéticas que por comparação de seqüências usando BLASTp (NCBI) observamos que apresentam domínios de ligação ao DNA. Dessa forma, existe a hipótese que elas podem funcionar como fatores regulatórios da expressão de genes durante o *quorum-sensing*.

No início do processo de transcrição de um determinado gene, o “core” da RNA polimerase deve ser recrutado por um fator sigma que se liga a uma seqüência específica do promotor do gene. Todos os fatores sigmas pertencem a basicamente duas famílias:

evolucionariamente relacionados à família do “housekeeping” Sigma70 de *E. coli* ou ao fator alternativo Sigma54. A família Sigma70 pode ou não precisar de um fator ativador no início do processo de transcrição do gene. Por outro lado, a RNA polimerase quando recrutada pelo fator sigma54, forma um complexo de iniciação instável, e só inicia o processo de transcrição quando é ativada por um fator de transcrição adicional chamado “fator ativador do sigma54” ou EBP (*enhancer binding protein*) (Barrios *et al.*, 1999). Adicionalmente, as seqüências de reconhecimento de Sigma70 está localizada nos sítios –10 e –35 no promotor, enquanto que as do Sigma54 esta presente nas posições –12 e –24 do promotor (Barrios *et al.*, 1999). O fator Sigma54 está associado à transcrição de muitos genes relacionados com vários processos como degradação de tolueno e xileno, transporte de ácidos dicarboxílicos, síntese da pili, fixação de nitrogênio, *quorum-sensing* (Wosten, 1998; Barrios *et al.*, 1999; Heurlier *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2004). Desse modo, ao identificarmos uma interação entre o domínio RpfG HD-GYP e o NtrC (um fator ativador do sigma54) analisamos os promotores dos genes em *Xanthomonas* conhecidos por terem sua expressão aumentada durante o *quorum-sensing* (genes que codificam enzimas extracelulares e síntese de EPS, e agora também, o gene *cmf*), e encontramos através de análise no proGrama PromScan (<http://molbiol-tools.ca/promscan/>) possíveis seqüências de ligação de Sigma54 com uma homologia de 80% com a seqüência consenso (TGGCAC-N5-TTGC): 5’ TCGCCC-GCAGC-TTGC 3’ na XAC0612 (*engA*) posição 138 “upstream” do ATG, e 5’ CGGCAC-AGATA-CTGC 3’ no operon *rpfGC* posição 118 “upstream” do ATG de *rpfG*. Experimentos futuros poderão dizer, se as possíveis seqüências regulatórias encontradas, nessas análises comparativas, são funcionais.

Sabemos que o genoma de *Xanthomonas* codifica para dois fatores sigmas54 XAC1969 e XAC2972. Ensaios de dois híbridos realizado em nosso laboratório por Maria Cláudia Pereda Rosa mostraram uma interação entre o fator sigma54 (XAC1969) e um regulador de transcrição com domínio LysR (XAC4350). Trabalhos recentes têm demonstrado que a família de reguladores de transcrição com domínio LysR atuam como repressores ou ativadores de transcrição de genes que codificam fatores de virulência em *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae*, *Vibrio cholerae* (Harris *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Kovacicova *et al.*, 2005), luminescência em *Vibrio harveyi* (Chatterjee *et al.*, 2002), flagelo em *Erwinia*

carotovora (Harris *et al.*, 1998) e relacionados com a adaptação fisiológica em bactérias durante o *quorum-sensing* (Harris *et al.*, 1998; Kovacikova *et al.*, 2005). Interessantemente, o gene XAC1969 está localizado próximo aos *locus* constituídos por genes cujos produtos formam o flagelo em *Xac* (XAC1941-1955 e XAC1972-1989). Dessa maneira suspeitamos que XAC1969 está regulando a expressão desses genes. Horns e Bonas (1996), estudando a função do homólogo de XAC2972, o segundo fator sigma54 codificado pelo genoma de *Xac*, em *X. campestris vesicatoria*, demonstraram que esse fator sigma54 é essencial para a utilização de nitrato quando essa é a única fonte de nitrogênio no meio. Dessa maneira fica a pergunta se XAC2972, que interagiu com o mesmo NtrC (XAC0208) que também interagiu com o domínio RpfG HDGYP (Fig. 38), desempenha outros papéis regulatórios adicionais à regulação da via do nitrogênio em *Xanthomonas*.

Estudos em Xac para definir uma possível função para CMF

6.7. O mutante de *Xac* com o gene *cmf* interrompido apresenta fenótipos diferenciados da cepa selvagem

Na tentativa de estudar a função do produto do gene *cmf* de *Xac*, nós produzimos o nocaute com o transposon EZ-Tn5<Kan-2> inserido na posição 1086 do gene. Interessantemente, as cepas mutantes não cresceram nos meios de cultura NA e NYGB, mas cresceram em outros meios como 2xYT, LB e L. De fato, não sabemos ainda explicar esse fenótipo dos mutantes, sendo que todos os meios de cultura utilizados são muito parecidos em suas composições. Desse modo, podemos especular que pequenas diferenças nos pH ou micronutrientes das soluções podem ter ocasionado o aparecimento desses fenótipos no mutante. Outra possibilidade, é que CMF participa de uma via metabólica em *Xac*, a qual foi comprometida nos nocautes, e ainda esse produto metabólico, que é importante para crescimento de *Xac*, não se faz presente nos meios NA e NYGB (seleção auxotrófica).

Nos ensaios de formação de biofilme em tubos de ensaio de vidro, observamos que as células mutantes praticamente não formam biofilme na parede dos tubos, diferentemente do selvagem. Crossman e Dow (2004) demonstraram que mutantes para genes *rpf*s em *Xcc* produzem menor quantidade de goma xantana que o tipo selvagem, e surpreendentemente

aderem melhor a paredes de tubos de plásticos. Dunger *et al.*, 2006 (dados ainda não publicados) também demonstraram que células mutantes de *Xac* com o gene *gumD* interrompido, portanto não produzem goma xantana, apresentam uma aderência igual ao selvagem em paredes de tubos de vidro. Esses resultados são indicativos que a goma xantana, o EPS produzido em maior quantidade em *Xanthomonas*, não é o fator principal para aderência de *Xanthomonas* a superfícies. De fato, trabalhos com outras bactérias, por exemplo *Pantoea stewartii stewartii* (Von Bodman *et al.*, 2003) e *E. coli* (Danese *et al.*, 2000) em condições de alta densidade celular aumentam a produção de EPS formando biofilme e diminuem a aderência a superfícies. Nós não sabemos quais produtos gênicos contribuem para a aderência de *Xanthomonas* a superfícies. Contudo o genoma de *Xac* codifica muitos produtos como fímbrias, pili e outras adesinas que podem desempenhar tal função (Crossman e Dow, 2004; da Silva *et al.*, 2002). Adicionalmente, bactérias geralmente produzem celulose como componente da matriz extracelular como forma de proteção mecânica e química, mas tem se demonstrado que em *Agrobacteria tumefaciens*, *Rhizobium spp*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium* a celulose também facilita a aderência no tecido hospedeiro e em superfícies (Matthysse *et al.*, 1981; Zogaj *et al.*, 2001; Solano *et al.*, 2002). Em *S. typhimurium* a síntese de celulose e outras estruturas adesivas, como fímbrias, é ativada pelo aumento de c-diGMP na célula, e portanto dessa forma há uma diminuição da mobilidade e uma tendência das células formarem biofilme com aparência rugosa (Kader *et al.*, 2006; Simm *et al.*, 2004). No genoma de *Xac* as subunidades constituintes da enzima celulose sintase são nomeadas XAC3515, XAC3517, XAC3518 e XAC3520 (da Silva *et al.*, 2002). Contudo ainda não sabemos se a celulose contribui para aderência de *Xac* a superfícies. A rugosidade observada nas colônias selvagens de *Xac*, mas ausente nas colônias mutantes, pode ser ocasionada por um aumento da produção de celulose e fímbrias agregativas nas cepas selvagens, como ocorre em agregados de *S. typhimurium*, ou porque os mutantes produzem mais goma xantana que os selvagens, o que ocasiona um fenótipo liso nas colônias. Se CMF atua na regulação negativa para produção de goma, e em adição, compete com RpfG e RpfF pelos domínios RR e Hpt de RpfC, nos mutantes como não existe essa competição, a produção de goma xantana pode ser aumentada devido a maior ativação dessas proteínas reguladoras (Fig. 37 e Fig. 38). Essa hipótese é coerente com o fato de que os mutantes, com gene *cmf* interrompido em *Xac*,

produzem mais goma xantana, e com isso diminuem a aderência nas paredes de tubos de vidro, e portanto não formam biofilme. Adicionalmente, a morfologia macroscópica de suas colônias tem uma aparência lisa, possivelmente ocasionada pelo acúmulo de goma xantana em volta das células.

As células mutantes de *Xac*, inoculadas em folhas jovens de laranja e limão cravo, apresentaram uma patogenicidade modificada quando comparada com a dos selvagens. Observamos o fenótipo *water soaking*, mas a hiperplasia, característica do estágio inicial de infecção por *Xac*, foi bastante reduzida nos mutantes. Brunings e Gabriel, (2003) propõem, assim como, demonstrado para *Ralstonia solanacearum* (Aldon *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Kim *et al.*, 2005) e *Yersinia pseudotuberculosis* (Pettersson *et al.*, 1996), que os fatores de virulência, no caso de *Xac*, responsáveis pela hiperplasia das células vegetais, durante o estágio inicial de infecção, são ativados quando *Xanthomonas* entra em contato direto com a parede das células do hospedeiro. Isso nos leva a supor que os mutantes apresentam dificuldade para se aderirem nas paredes das células do hospedeiro. Portanto, o produto do gene *cmf* de *Xac* desempenha uma função importante no estágio inicial do desenvolvimento do cancro cítrico, possivelmente relacionada à aderência da bactéria à célula do hospedeiro.

Figura 38. Modelo de regulação do *quorum-sensing* em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Andrade *et al.*, 2006). Interações observadas em nosso laboratório são indicadas por linhas grossas. Interações inferidas entre NtrC e NtrB são indicadas por linhas tracejadas. Em condições de alta densidade celular, DSF liga no domínio sensor de RpfC resultando na fosforilação do domínio HK. O grupo fosfato pode ser transferido para os domínios RR e Hpt de RpfC, e então para o domínio RR de RpfG. A fosforilação do domínio RR de RpfG deve modular a interação do seu domínio HD-GYP ao domínio GGDEF de um grupo de proteínas de *Xac*, desse modo a concentração de c-diGMP na célula é regulada de maneira dependente da densidade celular. O domínio HD-GYP também pode interagir com NtrC e dessa forma contribuir para regulação da expressão de genes cuja transcrição é dependente de Sigma54 e seu ativador. Abreviações: DSF, fator de sinalização difusível; F, RpfF; Tm, domínio transmembrana; HK, domínio histidina cinase; RR, domínio regulador de resposta; Hpt, domínio histidina fosfotransferase; PAS, domínio PAS; GGDEF, domínio diguanilato ciclase; Sigma54 activ.; domínio ativador de Sigma54 dependente de ATP; HTH, domínio de ligação ao DNA (hélice-volta-hélice); P, grupos fosfatos ligados nos resíduos conservados de aspartato nos domínios RR e histidina nos domínios HK e Hpt; IM, membrana interna.

Figure 39. Arquiteturas das proteínas GGDEF codificadas pelo genoma de *Xac*. As proteínas foram agrupadas de acordo com as similaridades dos seus domínios. O número do gene no genoma de *Xac* que codifica a proteína (Da Silva *et al.*, 2002) estão mostrados no lado direito. Destacado em roxo estão os números dos genes que codificam as proteínas com domínio GGDEF que interagiram com o domínio RpfG HD-GYP no ensaio de dois híbridos (Table 2), o número de vezes que a interação foi observada esta em parênteses. As seguintes proteínas com domínio GGDEF são preditas terem hélices transmembranas pelo proGrama PSort (Nakai and Horton, 1999): XAC3460, 1570, 1939, 1940, 1486, 0593, 0644, 2382, 2711, 1938, 2812, 1993, 2897, 1345 and 1488. Os nomes dos domínios estão de acordo com o Pfam database (<http://pfam.wustl.edu/>) com exceção do “tetraatricopeptide repeats” nomeado de “34” na figura. (Figura derivada de Andrade *et al.*, 2006).

Xac0258 TEELSRTDELTGLHNRRLA--LHLQEC--RRAGHVPVGLLILIDIDFFKINDEFGHLA 56
 Xac1486 LEELASLDALTGLPNRRMLERALTHQID--QQPHDLNLSLIILIDIDFFKQVNDLYGHAA 58
 Xac0593 LSRLAMRDELTGLPNRRRAIRTEAQQIE--QALRSHTPGMLALIDIDFFKQVNDLYGHAT 58
 Xac0614 LLDDAQNNALTGLNRNKTFFDDVILRLFAGGADSAAEQGVWLGIVIDIDFFKQVNDLYGHLY 60
 XAC2482 LQDLATRDFTGLPNRRYFLEQSQRVIP--KLLEDQTVTAAMVIDIDFFKINDEFWGHGA 58
 XAC3460 LEYRASHDVLTAALPNRREAERVLQWFD--EAHAGGAALALALMDIDIDFFKINDDYGHV 58
 Xac1939 LALKASHDALTGLNRRSGILEAMAEELQGAHGE--HPLAVVLIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1940 LSLKATHDELTGLNRRAGILAALRMLLHAHQG--RPLAVVLIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1420 LAEQASRDALTGVFNHQLGTALTHEFELASRQG--WPLSIAFIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1570 FERQAHEDALTGLPNRRHFDEALARDISRARRSA--RPLVLAIDIDIDFFKINDDYGHV 58
 Xac0644 LKKHALFDPLTEALNRRGCEQAMRDSVIASQREG--WPFVLFVLDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac4358 -LEWSFTDPLTNCYNRRFLDELDRDPVR-----WGCIVVDIDIDFFKQVNDLYGHV 51
 Xac0424 VAGLVREDQLTGALNRRGFEEFQREAVRTQSG--QPLCVMLIDIDIDFFKINDEFTHGHAG 58
 Xac1345 LRRQSIRDALTGLYNRRYLEESLSHELARCARRG--LPLVLMIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1488 LRQQSIRDPLTGLYNRRYLEETLSHELARCTRRE--LPLSVMLIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac2897 LSTEAWVDALTGLNRRFAFDRLSRALQDAVRLE--APLSVLMIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac2810 LVEQTRTDPLTGLPNRRFAVALAAATEQTRAVG--QPLSVALLIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac2446 VELDALRDALTGRWNRAGLEHALHALADAPSS--AADAPLGMFLIEDIDFFKQVNDLYGHV 59
 Xac2812 VAFHARHDAMTGLINRHEIERLLRLIELPQ--SPQMCHALCFVIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac0610 MHERATRDALTGLPNRRHAWSEALQVAVQAQQQQ--RSVAVMFLIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 XAC2711 ILHQARHDALTGLPNRIWLLERLKDQVVDQTVASG--GTAAVLILIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac2382 VRHMAITDALTGLTNRLGFREGLDHLHTARSTD--SKLALLFADIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1938 LALATLHDPLTRLPNRIILLHEHLVQNIERARQGG--QRFVAVMLINIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1993 IELLAHYDRITGLPNRRFLREQAENAIREANERG--QTLAMLLIDIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1887 VHQLAFYDTITGLPNRIMFSARAEQALTQAEYAG--EPAALMFINIDIDIDFFKQVNDLYGHV 58
 Xac1992 -----IVKPTRLGAGSPPELLHLVDAASGG--PPLMIFHVIDIDIDIDFFKQVNDLYGHV 49
 Xac2398 ---LRQRDQVTGLNRRPTFMVALEQAVAGRSE--QSGFLIEEDYARILFEFGDLS 55
 Xac1795 LRSTTYRDGTGLPNRRSFSDDLQWLSQRDAPATTAVAIQVCGSDYDFKQVNDLYGHV 60
 Xac0495 --VSRSNPETGLPTRGHVMDLLADALERKQSGG-----LFFIEIASALGLRERYGYAA 52
 XAC3272 .-----LNRLYDPATFRELLQSADHHSDE---QGGILLFDIDLTSS-----GNQT 43

Xac0258 GDRVLQNV-----HALRSVIAEGDLARIGGDEFVVLVAQGTSELVHHIGECIVR-AVEA 111
 Xac1486 GDAALSDLA-----TILRFVREPHQVVERGGEEFVVLRLAGSLAELEAATERLRK-VIRN 113
 Xac0593 GDTVLKALA-----SASRLALRGQDLRLRGGEEFLLVLPVCGGEEIPTVFTRLRS-AVAA 113
 Xac0614 GDEVLLVA-----QLMQRAFQDDLLERGGEEFVIVLRGVDRDTAVSLFERFLRAVAEH 116
 XAC2482 GDQALRAVA-----ASVSGHARPDQDLVARGGEEFLLVPLGLDAANATSYFETLRERISA- 113
 XAC3460 GDAVLSAIG-----EVLSEQDQAHCFARGGEEFLLAATGLDAVQARALFERMRQRLAD- 113
 Xac1939 GDAVLAKVG-----ARLTACLRDSRVGRGGEEFLLVLPVCGGEEIPTVFTRLRS-AVAA 113
 Xac1940 GDAVLAVG-----RRMDTLMRGDDRIARGGEEFLLVLPVCGGEEIPTVFTRLRS-AVAA 113
 Xac1420 GDEVLRNFA-----QTLQRMVTRSDLVARGGEEFVILPNTPADAAALMVERILAEART 114
 Xac1570 GDAVLHEVG-----VLLTAARASDLPARGGEEFALLADTTLDEA-QALCLIRALFHA 113
 Xac0644 GDRVLVRLV-----DSAYGWLGAQDWVGRGGDEFLLIGIHAS-----EDDATLKLNGWLSML 110
 Xac4358 GDEVIVQMA-----WFLNQPLRTQDRVLRGGDEFVLLVHQA-----SQTQLDALKRDY- 100
 Xac0424 GDAALRHTV-----EVAKAVLRITDAIARGGEEFVLLLPDSTIFEASAIVRLQALSQR 114
 Xac1345 GDLLAAVG-----ELLTLRLAEDVACRGGEEFVLLLPDADGEEAMRVAEQIRGYIAAL 114
 Xac1488 GDRVLAAIG-----ELLQAQTRGEDICRRGGEEFTIILPEVDLPACMMAEKLRAGIEAL 114
 Xac2897 GDACLRLIAG-----AIAGCSRRSEDLAARGGEEFGLMILPHTDAAGALRLDAVRNAVAEL 115
 Xac2810 GDAVLRLELS-----TLRLAHMAGAGTIAARGGEEFVLLLPNANLLQARVQCEYLRQSVAM 114
 Xac2446 ADATLLQVAT-----LLEAQLP-AAIVARLACDQFCVALPATAASAALAAEDLRKAVEDA 115
 Xac2812 GDRFLCHFAD-----VITMQLRS-GDWLGRGGDEFALLANTDLAQIIVLERMHGAALGQP 114
 Xac0610 GDAVIVAFG-----SCLQRAAGERYIVARLAGDEFVLLDGLQDAQAECAVAERIRTLAA 114
 XAC2711 ADQVLVEAGRRLVDVQEPN-----LVGRGSGDEFMVVVAQADAAS-VQQDAQRLLLQLRR 113
 Xac2382 GDEALLQFASRISRAVAALGGDAILARFGGDEFVILLQSGDVSLLAAQLADRLVHLSR 118
 Xac1938 GDRLLVVVAERLNAHRRHAG-----SLARLGADEF-VLVADIADPEDAAALAAHLVQALAV 113
 Xac1993 GDNLLKLASARLHQHLRNSD-----LFGRTSDEFIVLLRDMSEPEDAGHVARKLIAALGE 114
 Xac1887 GDGLLRDIALRVNDQVAATA-----MLARLSGDEFALALPQCS-AEQASAAERLLVSIAS 113
 Xac1992 GDQALTLAAR-----RLQEFLGARGKLWRHSGDEMVVAVRRDDTPLPEDFAEIEIRQQL 105
 Xac2398 ADALIAALA-----AHVASVLDDSVLAARFGHHSFALLNGN-YARThALAEtVRNAFAQH 110
 Xac1795 ADGYIALAQR-----RLAAYLPGGTLLYRLDPTTFGFLAQAEQ--QRLATLCTKVSKAFT 114
 Xac0495 YERLMTQAG-----HRLASAAQPYPLARLNDNSFLLAVDMPEASLEQQALEIRQLSAN 107
 XAC3272 GSDQDASTAIGLLRQATRP---QDSLACLAEGEFAVFLPGSSSEAGLVSIARRIQSSLSGR 100

Figura 40. Alinhamento parcial dos resíduos de aminoácidos das proteínas com domínio GGDEF codificadas pelo genoma de *Xac* (da Silva *et al.*, 2002). As caixas destacam os resíduos conservados em domínios GGDEF funcionais próximo ao seu sítio catalítico (GGDE/DF). Todos os domínios foram caracterizados usando o proGrAma Pfam (<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>) e alinhados usando o proGrAma ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

```

XAC1135      G D R C I Q A A D G L V N R L C L L V A G S A - R T C H P S M P R V E E G V A M K A P L G S A -- L V A - M A L L A G C   59
XAC3518      Q V R S A H R V P - L D V P V T L Y L P D G D - V L P S R S V N F S T G G M A I M L A Q P Q P -- I E P G L P V Q I G L   630
XAC1971      V Q R M D A K L D L M L A L I G R L V R Q G D S G L S Q G M V H S V R G I R L S C A T S H P P G T T G S V C L Q P S D   130
XAC3402      T R R A P R R Q P T D L L P V I D T L S E V Q I G R V G --- N V S E T G M L L L A S V P L H D D A L Y Q L R F S L P E   61
              *           :       :                               * :       .               :       .

XAC1135      A R D V G E Q Y V G K W V D V K S E K H V -- L S I E H N G E S F I I R D T Q P E L F G N G V K T -   106
XAC3518      S H R G V E Q T L P A V V R Q D R D G Q --- V S I Q F T -- Q M S M E Q E R - W L V A S T F A --   672
XAC1971      W L P E L V Q L P A T V L A N A S D G H D V W L W L R F A P L A P G L Q D A L E R H L F R L H R R Q   180
XAC3402      R V G R A T E I D V G V H L L W S E A A H A P G Q A W A G F R F L T M S E P H R Q R L R A W I A E -   110

```

Figura 41. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos dos domínios PilZ identificados no genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Amikan e Galperin, 2005). A análise do alinhamento revela uma baixa identidade de resíduos encontrada entre esses domínios PilZ. XAC1135, proteína PilZ envolvida na montagem da fimbria tipo IV (Alm *et al.*, 1996). XAC3518, subunidade A da celulose sintase (da Silva *et al.*, 2000). XAC1971 e XAC3402, proteínas hipotéticas. O alinhamento foi realizado com o proGrama ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Figura 42. Possíveis funções regulatórias desempenhadas pela interação entre os domínios HD-GYP e GGDEF. A ligação de RpfC e/ou NtrC aos domínios RR e HD-GYP, respectivamente, de RpfG (A) ou a fosforilação do domínio RpfG-RR (B) pode regular positivamente ou negativamente sua associação com, e a atividade do domínio, GGDEF (C). A associação do domínio GGDEF a HD-GYP e sua atividade de diguanilato ciclase pode ser reguladas positivamente ou negativamente pela própria interação com HD-GYP ou pela fosforilação do domínio RR de RpfG (C). Da mesma forma, a fosforilação de RpfG e a sua interação com outras proteínas podem modular a atividade de fosfodiesterase do domínio HD-GYP (D, E e F). A interação HD-GYP – GGDEF pode facilitar a transferência de c-diGMP para seu alvo específico, e controlar localmente a concentração desse segundo mensageiro na célula.

Conclusão

7. Conclusões

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho nos permitem fazer as seguintes colocações:

- 1) A caracterização de interações entre as proteínas RpC-RpfG, RpfC-RpfF e RpfC-CMF, com a determinação dos domínios de RpfC envolvidos em cada interação, confirma a importância da ligação proteína-proteína como atividade regulatória de processos fisiológicos na célula bacteriana. Adicionalmente, depois de observarmos essas interações, entre proteínas Rpfs e CMF, o processo de *quorum sensing* em *Xanthomonas* se tornou um mecanismo com maior complexidade, envolvendo percepção, transdução do sinal, produção de efetores, regulação de segundo mensageiro, e ainda um “feedback” negativo.
- 2) Mostramos uma ligação direta entre o mecanismo de *quorum sensing* e de sinalização pelo segundo mensageiro c-diGMP através da interação do domínio HD-GYP da RpfG e domínios GGDEF de proteínas codificadas pelo genoma de *Xac*. Essa interação levanta várias questões: Será que HD-GYP interage com o domínio GGDEF para hidrolisar o diGMP cíclico no local onde ele está sendo produzido? Essa hipótese é interessante, visto que, mudanças nas concentrações de c-diGMP cíclico na célula parecem ser discretas e localizadas. De outro modo, a interação de HD-GYP/GGDEF pode funcionar como um processo de regulação da atividade catalítica de GGDEF e/ou HD-GYP? Outra pergunta ainda não respondida é como a mudança na concentração de diGMP cíclico na célula leva a alteração da expressão de genes específicos como o operon *gum*, *rpfs* e *cmf*, ou da atividade catalítica de proteínas como a celulose sintase e PilZ. Finalmente, identificamos interações de proteínas, como, por exemplo, PTKS e HsmF, cujos homólogos atuam regulando a patogenicidade em outras bactérias, com o domínio HD-GYP. Dessa forma, será que o domínio HD-GYP estaria funcionando como uma fosfatase? Ou ainda qual a relevância dessas interações no processo de *quorum-sensing* em *Xanthomonas*?
- 3) Estudos com o mutante *cmf* de *Xac* nos revela que CMF tem um papel importante em processos celulares que são tipicamente regulados pelo *quorum sensing* como produção de goma xantana, formação de biofilme, morfologia de colônia e patogenicidade. Entretanto, ainda não sabemos se CMF é secretada ou fica associada à membrana citoplasmática, e sua real função nesses processos bacterianos complexos ainda tem que ser elucidado.

De fato, temos muitas perguntas envolvendo o mecanismo de *quorum sensing* de *Xac* para serem respondidas em experimentos futuros. Podemos dizer que estamos na ponta de um imenso *iceberg*, onde nossa contribuição ajudou revelar novas camadas de complexidade dessa rede de controle de comportamento e fluxo de informação na célula bacteriana.

Bibliografia

8. Bibliografia

Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J*. May 15;19(10):2304-14.

Alegria MC. (2004). *Tese de doutorado*. IQ-USP. São Paulo.

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

Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS. (2005) Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J Bacteriol*. Apr;187(7):2315-25.

Alm RA, Boder AJ, Free PD, Mattick JS. (1996) Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. Jan;178(1):46-53.

Amikam D, Benziman M. (1989) Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. Dec;171(12):6649-55.

Amikam D, Galperin MY. (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*. Jan 1;22(1):3-6. Epub 2005 Oct 25.

Andrade MO, Alegria MC, Docena C, Guzzo CR, Rosa MCP, Ramos CHI and Farah CS. (2006) The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf Quorum sensing pathway and a large subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv citri. *Molecular Microbiology*. Aceito.

Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB. (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell*. 86(6): 845-8. Review.

Aravind L, Ponting CP. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci*;22:458-459.

Aravind L, Koonin EV. (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci*. Dec;23(12):469-72.

Bainton NJ, Bycroft BW, Chhabra SR, Stead P, Gledhill L, Hill PJ, Rees CE, Winson MK, Salmond GP, Stewart GS, et al. (1992) A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene*. Jul 1;116(1):87-91.

Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJ, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ. (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol.* May;24(3):555-66.

Barrios H, Valderrama B, Morett E. (1999) Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* Nov 15;27(22):4305-13.

Bassler BL, Wright M, Silverman MR. (1994) Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol.* 1994 May;12(3):403-12.

Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Howe KL, Marshall M, Sonnhammer EL (2002) The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research.* 30:276-280.

Baysse C, Cullinane M, Dénervaud V, Burrowes E, Dow JM, Morrissey JP, Tam L, Trevors JT & O'Gara F. (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151, 2529–2542.

Boettcher KJ, Ruby EG. (1990) Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the Sepiolid Squid *Euprymna scolopes*. *J. Bacteriol.*, 172: 3701-3706.

Brazill, D.T., Lindsey, D.F., Bishop, J.D., and Gomer, R.H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 8161-8168.

Brunings AM. e Gabriel DW. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Path.* 4, 141–157.

Camilli A, Bassler BL. (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* Feb 24;311(5764):1113-6. Review.

Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG. (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 4;98(25):14613-8. Epub 2001 Nov 27.

Chan JWYF, Goodwin PH. (1999) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Advances.* 17, 489-508.

Chang AL, Tuckerman JR, Gonzalez G, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M, Gilles-Gonzalez MA. (2001) Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry.* Mar 27;40(12):3420-6.

Chatterjee J, Miyamoto CM, Zouzoulas A, Lang BF, Skouris N, Meighen EA. (2002) MetR and CRP bind to the *Vibrio harveyi* lux promoters and regulate luminescence. *Mol Microbiol.* Oct;46(1):101-11.

Chou FL, Chou HC, Lin YS, Yang BY, Lin NT, Weng SF, Tseng YH. (1997) The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 7;233(1):265-9.

Crossman L, Dow JM. (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect.* May;6(6):623-9. Review.

Danese PN, Pratt LA, Kolter R. (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* Jun;182(12):3593-6.

da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature.* 417(6887):459-63.

Danese PN, Pratt LA, Kolter R. (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* Jun;182(12):3593-6.

Darby C, Hsu JW, Ghori N, Falkow S. (2002) *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature.* May 16;417(6886):243-4.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Igilewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* Apr 10;280(5361):295-8.

Dawkins R, Krebs JR. (1979). Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal society of London*, B 205, 489-511.

de Crecy-Lagard V, Glaser P, Lejeune P, Sismeiro O, Barber CE, Daniels MJ, Danchin A. (1990) A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J Bacteriol.* Oct;172(10):5877-83.

Deery, W.J. and Gomer, R.H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 34476-34482.

Deery WJ, Gao T, Ammann R, Gomer RH. (2002) A single cell density-sensing factor stimulates distinct signal transduction pathways through two different receptors. *J Biol Chem.* Aug 30;277(35):31972-9. Epub 2002 Jun 17.

Deutscher J, Herro R, Bourand A, Mijakovic I, Poncet S. (2005) P-Ser-HPr--a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochim Biophys Acta*. Dec 30;1754(1-2):118-25. Epub 2005 Sep 12. Review.

Dow JM, Daniels MJ. (1994) Pathogenicity determinants and global regulation of pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Curr Top Microbiol Immunol*.192:29-41. Review.

Dow JM, Feng JX, Barber CE, Tang JL, Daniels MJ. (2000) Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. *Microbiology*. Apr;146 (Pt 4):885-91.

Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 16;100(19):10995-1000. Epub 2003 Sep 5.

Drenkard E, Ausubel FM. (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*. Apr 18;416(6882):740-3.

Dunlap PV, Greenberg EP. (1988) Control of *Vibrio fischeri* lux gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-luxR protein regulatory circuit. *J Bacteriol*. Sep;170(9):4040-4046.

Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. May 5;435(7038):43-57.

Falke JJ, Hazelbauer GL. (2001) Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci*. Apr;26(4):257-65.

Fekkes P, Driessen AJ. (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev*. Mar;63(1):161-73. Review.

Flavier, A. B., S. J. Clough, M. A. Schell, and T. P. Denny. (1997) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 26:251-259.

Galperin MY, Natale DA, Aravind L, Koonin EV. (1999) A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol.* Nov;1(2):303-5.

Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 203(1):11-21. Review.

Galperin MY. (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol.* Jun;6(6):552-67. Review.

Galperin, M.Y. and M. Gomelsky. (2005) Bacterial signal transduction modules: From genomics to biology. Features. *ASM News* 71: 326-333.

Genin S, Brito B, Denny TP, Boucher C. (2005) Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett.* 579(10): 2077-81.

Gietz *et al.*, (1998). [online]. Available: <http://research.bmn.com/tto/search/results>

Glessner A, Smith RS, Iglewski BH, Robinson JB. (1999) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J Bacteriol.* 1999 Mar;181(5):1623-9.

Hall RA. (2004) Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far western blot. Protein-Protein Interactions methods and applications. Edited by Fu H. *Methods in Molecular Biology.* 261 (167-174). Human Press. New Jersey, USA.

Harris SJ, Shih YL, Bentley SD, Salmond GP. (1998) The hexA gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Mol Microbiol.* May;28(4):705-17.

He YW, Xu M, Lin K, Ng YJ, Wen CM, Wang LH, Liu ZD, Zhang HB, Dong YH, Dow JM, Zhang LH. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. (2006). *Mol Microbiol.* Jan;59(2):610-22.

Heurlier K, Denervaud V, Pessi G, Reimann C, Haas D. (2003) Negative control of quorum sensing by RpoN (sigma54) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* Apr;185(7):2227-35.

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

Hisert KB, MacCoss M, Shiloh MU, Darwin KH, Singh S, Jones RA, Ehrt S, Zhang Z, Gaffney BL, Gandotra S, Holden DW, Murray D, Nathan C. (2005) A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol.* Jun;56(5):1234-45.

Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 436(7054): 1171-5.

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

Hsiao YM, Liao HY, Lee MC, Yang TC, Tseng YH. (2005) Clp upregulates transcription of *engA* gene encoding a virulence factor in *Xanthomonas campestris* by direct binding to the upstream tandem Clp sites. *FEBS Lett.* Jul 4;579(17):3525-33.

Hsiao YM, Tseng YH. Transcription of *Xanthomonas campestris* *prtI* gene encoding protease 1 increases during stationary phase and requires global transcription factor Clp. (2002) *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 5;295(1):43-9. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Aug 30;296(4):1034.

Jain R, Yuen IS, Taphouse CR, Gomer RH. (1992) A density-sensing factor controls development in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* Mar;6(3):390-400.

Jain R, Gomer RH. (1994) A developmentally regulated cell surface receptor for a density-sensing factor in *Dictyostelium*. *J Biol Chem.* Mar 25;269(12):9128-36.

James P, Halladay J, Craig EA. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* Dec;144(4):1425-36.

Jenal U. (2004) Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol.* Apr;7(2):185-91. Review.

Kader A, Simm R, Gerstel U, Morr M, Romling U. (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in *rdar* morphotype development of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol Microbiol.* May;60(3):602-16.

Kang Y, Liu H, Genin S, Schell MA, Denny TP. (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol.* Oct;46(2):427-37.

Kim J, Kim JG, Kang Y, Jang JY, Jog GJ, Lim JY, Kim S, Suga H, Nagamatsu T, Hwang I. (2004) Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol Microbiol.* Nov;54(4):921-34.

Kim J, Ahn K, Min S, Jia J, Ha U, Wu D, Jin S. (2005) Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. Nov;151(Pt 11):3575-87.

Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol*. Oct;50(1):61-8.

Kulesekara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, Miyata S, Lee DG, Neely AN, Hyodo M, Hayakawa Y, Ausubel FM, Lory S. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 13; [Epub ahead of print]

Kirillina O, Fetherston JD, Bobrov AG, Abney J, Perry RD. (2004) HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol*. Oct;54(1):75-88.

Klumpp S, Krieglstein J. (2002) Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur. J. Biochem*. 269(4): 1067-71. Review.

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

Kustu S, Santero E, Keener J, Popham D, Weiss D. (1989) Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev*. Sep;53(3):367-76. Review.

Lee BM, Park YJ, Park DS, Kang HW, Kim JG, Song ES, Park IC, Yoon UH, Hahn JH, Koo BS, Lee GB, Kim H, Park HS, Yoon KO, Kim JH, Jung CH, Koh NH, Seo JS, Go SJ. (2005) The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res*. Jan 26;33(2):577-86.

Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. (2004) The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell*. Jul 9;118(1):69-82.

Lewis Carroll. 1960 (reprinted). The Annotated Alice: Alice's Adventures in Wonderland and Through the Looking-Glass, illustrated by J. Tenniel, with an Introduction and Notes by M. Gardner. The New American Library, New York, 345 pp. *Through the Looking-Glass and What Alice Found There*.

Lillard JW Jr, Fetherston JD, Pedersen L, Pendrak ML, Perry RD. (1997) Sequence and genetic analysis of the hemin storage (hms) system of *Yersinia pestis*. *Gene*. Jul 1;193(1):13-21.

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

Matt Ridley. (1995) *The Red Queen: Sex and the Evolution of Human Nature*, Penguin Books, ISBN 0140245480.

Matthysse AG, Holmes KV, Gurlitz RH. (1981) Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol*. Jan;145(1):583-95.

Mehta A, Rosato YB. (2005) Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* by representational difference analysis of cDNA. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 28, p. 140-149.

Miller, M. B., and B. L. Bassler. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. 55:165-199.

Minogue TD, Carlier AL, Koutsoudis MD, von Bodman SB. (2005) The cell density-dependent expression of stewartan exopolysaccharide in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* is a function of EsaR-mediated repression of the *rcaA* gene. *Mol Microbiol*. Apr;56(1):189-203.

Nakai, K. and Horton, P. (1999) PSORT: a proGram for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization, *Trends Biochem. Sci*, 24(1) 34-35.

Nasser, W., M. L. Bouillant, G. Salmond, and S. Reverchon. (1998) Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol*. 29:1391-1405.

Newman, K.L.; Almeida, R.P.P.; Purcell, A.H.; and Lindow, S.E. (2004) Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 1737-1742.

Parsek MR, Greenberg EP. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol*. Jan;13(1):27-33. Review.

Paul R, Weiser S, Amiot NC, Chan C, Schirmer T, Giese B, Jenal U. (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev*. Mar 15;18(6):715-27.

Pettersson J, Nordfelth R, Dubinina E, Bergman T, Gustafsson M, Magnusson KE, Wolf-Watz H. (1996) Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*. Aug 30;273(5279):1231-3.

Piper KR, Beck von Bodman S, Hwang I, Farrand SK. (1999). Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol*. 32:1077-89.

- Poplawsky AR, Chun W. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional pigB for epiphytic survival and host infection. *Mol Plant Microbe Interact.* Jun;11(6):466-75.
- Poplawsky AR., Walters DM., Rouviere PE, Chun W. (2005) A gene for a dioxygenase-like protein determines the production of the DF signal in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology.* 6, 653 - 657.
- Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. (2002) Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun.* May;70(5):2640-9.
- Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Aug;37(8):1103-9.
- Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57(3):629-39. Review.
- Romling U, Amikam D. (2006) Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol.* Apr;9(2):218-28. Epub 2006 Mar 10.
- Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, Wroom E de, van der Marel GA, van Boom JH *et al.* (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature.* 325 pp. 279–281.
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Crossman LC, Spiro S, He YW, Zhang LH, Heeb S, Camara M, Williams P, Dow JM. (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 12; [Epub ahead of print]
- Sambrook J, Russel DW. (2001) *Mol. Cloning: A Lab. Manual.* Ed.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Romling U. (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol.* Aug;53(4):1123-34.
- Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT. (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol.* 3(10): e334.
- Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE, Daniels MJ, Dow JM. (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol.* Dec;38(5):986-1003.
- Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol.* Feb;43(3):793-808.

Solomon JM, Magnuson R, Srivastava A, Grossman AD. (1995) Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 9:547–58.

Studholme DJ, Dixon R. (2003) Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol.* Mar;185(6):1757-67. Review. No abstract available.

Sun Q, Wu W, Qian W, Hu J, Fang R, He C. (2003) High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. *FEMS Microbiol Lett.* Sep 12;226(1):145-50.

Swings JG e Civerolo EL. (1993). *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall.

Tang JL, Liu YN, Barber CE, Dow JM, Wootton JC, Daniels MJ. (1991) Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet.* May;226(3):409-17.

Tal R, Wong HC, Calhoon R, Gelfand D, Fear AL, Volman G, Mayer R, Ross P, Amikam D, Weinhouse H, Cohen A, Sapir S, Ohana P, Benziman M. (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol.* Sep;180 (17):4416-25.

Tamayo R, Tischler AD, Camilli A. (2005) The EAL domain protein *VieA* is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 30;280(39):33324-30.

Taylor BL, Zhulin IB. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* Jun;63(2):479-506. Review.

Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Buttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klosgen U, Patschkowski T, Ruckert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorholter FJ, Weber E, Puhler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol.* Nov;187(21):7254-66.

Tischler AD, Camilli A. (2004) Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol.* Aug;53(3):857-69.

Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* Feb 10;403(6770):623-7.

- Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. (2005) One-component systems dominant signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 13(2): 52-6.
- Van Haastert PJ, Bishop JD, Gomer RH. (1996) The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *J Cell Biol.* Sep;134(6):1543-9.
- Van Valen L. (1973) "A New Evolutionary Law", *Evolutionary Theory* 1, p. 1-30.
- Visick KL, Foster J, Doino J, McFall-Ngai MJ and Ruby EG. (2000) *Vibrio fischeri lux* genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *J. Bacteriol.* 182:4578–4586.
- Vojnov AA, Zorreguieta A, Dow JM, Daniels MJ, Dankert MA. (1998) Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology.* Jun;144 (Pt 6):1487-93.
- Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL. (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 41:455-82. Review.
- Wang, L-H, He, Y., Gao, W., Wu, J.E., Dong, Y-H, He, C., Wang, S.X., Weng, L-X., Xu, J-L., Tay, L., Fang, R.X., and Zhang, L.-H. (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology.* 51, 903-912.
- Waters CM, Bassler BL. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:319-46. Review.
- Whitchurch CB, Leech AJ, Young MD, Kennedy D, Sargent JL, Bertrand JJ, Semmler AB, Mellick AS, Martin PR, Alm RA, Hobbs M, Beatson SA, Huang B, Nguyen L, Commolli JC, Engel JN, Darzins A, Mattick JS. (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* May;52(3):873-93.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* Aug;25(4):365-404. Review.
- Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, Winzer K, Middleton B, Pritchard DI, Bycroft BW. (2000) Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* May 29;355(1397):667-80. Review.
- Wilson TJ, Bertrand N, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Barber CE, Dow JM, Daniels MJ. (1998) The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. *Mol Microbiol.* Jun;28(5):961-70.
- Withers H, Swift S, Williams P. (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.* Apr;4(2):186-93. Review.

Wosten MM. (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev.* Sep;22(3):127-50. Review.

Zhang LH, Dong YH. (2004) Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol.* 53(6): 1563-71.

Zhuo Q, Piao JH, Wang R, Yang XG. (2005) Refolding and purification of non-fusion HPT protein expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* May;41(1):53-60.

Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol.* Mar;39(6):1452-63.

Anexos

9. Anexos

Curriculum Vitae

Dados Pessoais:

Nome: Maxuel de Oliveira Andrade

Local e data de nascimento: Guaçuí, Espírito Santo, 04 de Dezembro de 1979.

Educação:

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) (1998-2002)

Prêmios:

Prêmio Arthur Bernardes, ano 2002, melhor trabalho de pesquisa (Iniciação Científica) na área de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Viçosa-MG/Funarbe.

Ocupação:

Bolsista de Mestrado, CNPq e Fapesp (2004-2006). Projeto: Caracterização bioquímica de interações proteína-proteína relacionadas com o mecanismo de *quorum sensing* do *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Artigos Publicados:

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

Rodrigues SM, **Andrade MO**, Gomes AP, Damatta FM, Baracat-Pereira MC, Fontes EP. (2006) Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *J Exp Bot.* 57(9):1909-18.

Festucci-Buselli RA, Carvalho-Dias AS, **de Oliveira-Andrade M**, Caixeta-Nunes C, Li HM, Stuart JJ, Muir W, Scharf ME, Pittendrigh BR. (2005) Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol*. Jan;14(1):69-77.

Alegria MC, Souza DP, **Andrade MO**, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS. (2005) Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol*. Apr;187(7):2315-25.

Mariano AC, **Andrade MO**, Santos AA, Carolino SM, Oliveira ML, Baracat-Pereira MC, Brommonshenkel SH, Fontes EP. (2004) Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*. Jan 5;318(1):24-31.

Buzeli RA, Cascardo JC, Rodrigues LA, **Andrade MO**, Almeida RS, Loureiro ME, Otoni WC, Fontes EP. (2002) Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems. *Plant Mol Biol*. Nov;50(4-5):757-71.