RESUMO

Souza, Ana Paula Silva de. Caracterização bioquímica e funcional da proteína XadA3 de *Xylella fastidiosa*. 2018. 133 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A adesão é um mecanismo de virulência amplamente conservado entre bactérias Gram-negativas e é utilizado por diversos patógenos para colonizar seus hospedeiros, sendo o primeiro passo do processo de desenvolvimento do biofilme. Uma variedade de apêndices celulares e proteínas está envolvida na adesão bacteriana, tais como *pili*, fimbrias, adesinas fimbriais e afimbriais. O fitopatógeno *Xylella fastidiosa*, agente causal de importantes doenças como a doença de Pierce de videiras, a clorose variegada dos citros e a síndrome do rápido declínio de oliveiras, possui em sua superfície várias dessas estruturas que são potencialmente responsáveis pela colonização eficiente de insetos-vetores e plantas hospedeiras. Entre as adesinas afimbriais codificadas no genoma dessa bactéria, três XadA (XadA1, Hsf/XadA2 e XadA3) são classificadas como autotransportadores triméricos. Dados da literatura sugerem que XadA1 e XadA2 são importantes para a formação do biofilme, porém a função de XadA3 ainda não havia sido investigada. Nesse trabalho, tivemos como objetivo caracterizar bioquímica e funcionalmente a proteína XadA3 e obter informações adicionais sobre o papel desempenhado por XadA1 e XadA2 na adesão e virulência de *X. fastidiosa*. Utilizando imunodeteção com um anticorpo policlonal anti-XadA3 por nós obtido, demonstramos que essa proteína localiza-se na superfície bacteriana e medeia a adesão intercelular. A caracterização dos fenótipos de mutantes de deleção de cada um dos genes das adesinas XadA revelou que o mutante $\Delta xadA3$ tem reduzida capacidade de agregação celular e formação de biofilme quando comparado tanto aos mutantes $\Delta xadA1$ e $\Delta xadA2$ como à cepa selvagem Temecula. A deleção dos genes *xadA* afeta marginalmente o perfil de expressão gênica global avaliado através de RNA-seq das cepas mutantes comparativamente à cepa selvagem, porém destaca-se, nas cepas mutantes, o aumento nos níveis dos transcritos de lipases/esterases. Já foi descrito que essas enzimas parecem atuar na degradação do tecido vegetal associada aos sintomas da doença de Pierce de videiras. A deleção de *xadA3* resulta em um fenótipo de hipervirulência em videiras, mas também de deficiência de transmissão pelo inseto-vetor. O conjunto dos resultados obtidos nesse trabalho evidenciam o importante papel desempenhado pelas adesinas XadAs, particularmente XadA3, na adesão intercelular, no desenvolvimento do biofilme e na virulência de *X. fastidiosa*.

Palavras-chave: XadAs, autotransportadores triméricos, adesinas, fitopatógeno, *Xylella fastidiosa*, biofilme, virulência.

ABSTRACT

Souza, Ana Paula Silva de. Biochemistry and functional characterization of *Xylella fastidiosa* XadA3 adhesin. 2018. 133 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Adhesion is a widely conserved mechanism of virulence among Gram-negative bacteria that is used by several pathogens to colonize their hosts, being the first step in biofilm development. A variety of appendages and proteins are involved in bacterial adhesion, such as pili, fimbriae, fimbrial and afimbrial adhesins. The phytopathogen *Xylella fastidiosa*, causal agent of important diseases such as Pierce's disease of grapevines, citrus variegated chlorosis and olive quick decline syndrome, harbours on its surface several of these structures that are potentially responsible for efficient colonization of insect vectors and plant hosts. Among the afimbrial adhesins encoded in the genome of this bacterium, three XadAs (XadA1, Hsf/XadA2 and XadA3) are classified as trimeric autotransporters. Data from the literature suggest that XadA1 and XadA2 are important for biofilm formation, but XadA3 function has not been yet investigated. In this work, we aimed to biochemically and functionally characterize the XadA3 protein and gather additional information about the role played by XadA1 and XadA2 in *X. fastidiosa* adhesion and virulence. Using immunodetection with a polyclonal anti-XadA3 antibody, we have demonstrated that this protein localizes to the bacterial surface and mediates intercellular adhesion. Phenotypic characterization of the deletion mutants of XadA adhesins encoded genes revealed that the $\Delta xadA3$ mutant has reduced cell aggregation capacity and biofilm formation when compared to both $\Delta xadA1$ and $\Delta xadA2$ mutants as well as to Temecula wild type strain. Deletion of the *xadA* genes marginally affects the global gene expression profile assessed by RNA-seq of the mutant strains compared to the wild-type strain, even though an increase in lipase/esterase transcripts levels was observed in the mutant strains. It has been reported that these enzymes appear to participate in the degradation of plant tissue that is associated with symptoms of Pierce's disease of grapevines. The deletion of *xadA3* results in a phenotype of hypervirulence in grapevines but also of deficiency in insect-vector transmission. The results obtained in this work evidenced the important role played by XadAs adhesins, particularly XadA3, in *X. fastidiosa* intercellular adhesion, biofilm development and virulence.

Keywords: XadAs, trimeric autotransporters, adhesins, *Xylella fastidiosa*, phytopathogen, biofilm, virulence