

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

THIAGO RODRIGO DOS SANTOS

**Caracterização de um efetor nuclease associado
ao sistema de secreção do Tipo IV de *Xanthomonas*
citri e seu inibidor cognato**

**Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
17/02/2023

THIAGO RODRIGO DOS SANTOS

**Caracterização de um efector nuclease associado
ao sistema de secreção do Tipo IV de *Xanthomonas
citri* e seu inibidor cognato**

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

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d722c dos Santos, Thiago Rodrigo
Caracterização de um efetor nuclease associado ao sistema de secreção do Tipo IV de Xanthomonas citri e seu inibidor cognato / Thiago Rodrigo dos Santos. - São Paulo, 2023.
123 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Farah, Shaker Chuck

1. Sistema de secreção do Tipo IV (X-T4SS). 3. Xanthomonas citri. 4. Nuclease. 5. AHH. I. T. II. Farah, Shaker Chuck, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Caracterização de um efetor nuclease associado ao sistema de secreção do Tipo IV de *Xanthomonas citri* e seu inibidor cognato"

THIAGO RODRIGO DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Prof. Dr. Shaker Chuck Farah
(Orientador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini
IQ - USP

Profa. Dra. Marilis do Valle Marques
ICB - USP

Prof. Dr. Henrique Ferreira
UNESP - RIO CLARO

SÃO PAULO
30 de maio de 2023

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, doador de todos os dons. Dedico também a meus pais e minha esposa. O apoio e compreensão que amorosamente me dedicaram tornou esta jornada possível

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço ao meu orientador, Chuck Farah, que abriu as portas de seu laboratório para que eu recomeçasse a minha jornada na ciência. Pela paciência, apoio e principalmente, pela disposição de dedicar o tempo que for necessário com seus alunos.

Aos meus companheiros de laboratório que sempre foram generosos e proporcionaram um ambiente produtivo e amigável. Muito do meu aprendizado devo a vocês. Bruno Matsuyama, Camila Schroeder, Daniela Sifuentes, Edgar Lhontop, German Sgro, Ilda Souza, Leonardo Talachia, Michella Brescia, Natalia Bueno, Santiago Arevalo, Sofia Quarello, William Cenens.

Gabriel Oka. Esse trabalho também é seu. Tem sua mão em todas as partes desta pesquisa. Obrigado pela dedicação, pela paciência e pela parceria.

Às agências de fomento CNPQ e FAPESP, que financiaram esse projeto e permitem que ciência de qualidade seja feita no país, apesar de tantas limitações. E especialmente ao CNPQ pela bolsa.

Aos professores que fizeram parte dessa caminhada, obrigado pelo conhecimento, o tempo e os recursos que foram compartilhados na minha formação e no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus pais, cujo apoio incondicional tornou possível a realização desse sonho. Tudo que alcancei devo a vocês. Obrigado pelos ensinamentos, cuidado, amor e todo apoio que vocês sempre me deram durante esse mestrado e durante toda a minha vida.

A minha esposa, Thaís, sempre acreditou em mim e que enfrentou a distância e as dificuldades que essa jornada acadêmica trouxe. Obrigado por toda a

paciência, suporte, carinho e amor que você me dá. Agradeço a Deus por ter você na minha vida.

A Deus, pela jornada. Nos bons e maus momentos o que sempre me manteve foi a certeza de que Seu amor infinito estava presente em cada passo.

“Ainda que eu (...) conheça todos os mistérios e toda a ciência (...) se não tiver amor, nada serei” (I Coríntios 13:2)

RESUMO

dos Santos, T.R. **Caracterização de um efetor nuclease associado ao sistema de secreção do Tipo IV de *Xanthomonas citri* e seu inibidor cognato**. 2023. 99p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bactérias desenvolveram diversos mecanismos que permitem antagonizar procariotos competidores que disputam recursos no mesmo nicho. Dentre os mais sofisticados, estão os sistemas de secreção de macromoléculas, que permitem que esses organismos transportem macromoléculas para fora das células. Alguns desses sistemas injetam efetores capazes de matar ou enfraquecer bactérias rivais. Foi identificado um sistema de secreção do Tipo IV (X-T4SS) em bactérias da ordem *Xanthomonadales* com a função de injetar efetores tóxicos com capacidade de matar bactérias Gram-negativas. Os genes desses efetores se encontram em operon com genes de inibidores cognatos, que protegem a bactéria de se auto intoxicar. Esse sistema está presente em *Xanthomonas citri*, um fitopatógeno que causa prejuízos em culturas de citros. Dentre os de efetores do T4SS bactericida de *X. citri*, encontramos X-Tfe^{XAC3266}, uma provável nuclease da família AHH, e seu inibidor cognato X-Tfi^{XAC3267}.

Neste trabalho, foi demonstrado que X-Tfe^{XAC3266} tem um potente efeito tóxico contra bactérias competidoras. Isto foi demonstrado por meio de ensaios de competição bacteriana, análises de microscopia, curvas de crescimento microbiano e medição do tempo de duplicação de células em co-cultura. Também foi possível atestar a atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266}. O efetor foi capaz de acionar a resposta do sistema SOS de reparo de DNA em *E. coli* e de degradar DNA plasmidial *in vivo* e *in vitro*. Em todos os experimentos descritos, X-Tfi^{XAC3267} inibiu os efeitos de X-Tfe^{XAC3266}, caracterizando-os como um par efetor/inibidor. Por fim, através de

ensaios de translocação com Cre recombinase, foi demonstrado que X-Tfe^{XAC3266} é capaz de alcançar o citosol da célula alvo independente do domínio nuclease.

O conjunto dos resultados permitem concluir que X-Tfe^{XAC3266} é um efetor antibacteriano do X-T4SS de *X. citri* com atividade nuclease que atua no citosol da célula alvo; e que X-Tfi^{XAC3267} é seu inibidor cognato

Palavras-chave: Sistema de secreção do Tipo IV (X-T4SS); Efeitores antibacterianos; *Xanthomonas citri*; Nuclease; AHH.

ABSTRACT

dos Santos, T.R. **Characterization of a nuclease effector associated with the *Xanthomonas citri* Type IV secretion system and its cognate inhibitor.** 2023. 99p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bacteria have developed several mechanisms that allow these organisms to antagonize competing prokaryotes that compete for resources in the same niche. One of the most sophisticated are macromolecule secretion systems, which allow bacteria to transport macromolecules out of cells. Some of these systems inject effectors capable of killing or weakening rival bacteria. A Type IV secretion system (X-T4SS) was identified in bacteria of the order Xanthomonadales with the function of injecting toxic effectors capable of killing Gram-negative bacteria. The genes of these effectors are in operon with genes of cognate inhibitors, which protect the bacterium from self-intoxication. This system is present in *Xanthomonas citri*, a phytopathogen that causes damage to citrus crops. Among the *X. citri* bactericidal T4SS effectors, we found X-TfeXAC3266, a probable nuclease of the AHH family, and its cognate inhibitor X-TfiXAC3267.

In this work, it was demonstrated that X-TfeXAC3266 has a potent toxic effect against competing bacteria. This has been demonstrated through bacterial competition assays, microscopy analyses, microbial growth curves and measurement of cell doubling time in co-culture. It was also possible to attest the nuclease activity of X-TfeXAC3266. The effector was able to trigger the SOS DNA repair system response in *E. coli* and to degrade plasmid DNA in vivo and in vitro. In all experiments described, X-TfiXAC3267 inhibited the effects of X-TfeXAC3266, characterizing them as an effector/inhibitor pair. Finally, through translocation assays with Cre recombinase, it was demonstrated that X-TfeXAC3266 is able to reach the target cell cytosol independent of the nuclease domain.

The set of results allow us to conclude that X-TfeXAC3266 is an antibacterial effector of *X. citri* X-T4SS with nuclease activity that acts in the cytosol of the target cell; and that X-TfiXAC3267 is its cognate inhibitor

Keywords: Type IV secretion system (X-T4SS); Antibacterial effectors; *Xanthomonas citri*; Nuclease; AHH.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – Albumina de soro bovino

ATP – Trifosfato de adenosina

CFU – unidades formadoras de colônia

Cm^r – Resistente a cloranfenicol

CRAFT – Ensaio de translocação com recombinase Cre

DO – Densidade Óptica

DO_(600nm) – Densidade Óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético

GFP – Proteína fluorescente verde

Gm^r – Resistente a gentamicina

IPTG – Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa – Quilodalton

kb – Quilopares de bases

Km^r – Resistente a canamicina

ORF – Fase aberta de leitura

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDB – Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank)

pv – Patovar

RFP – Proteína fluorescente vermelha

RPM – Rotações por minuto

SEC-MALS – Cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz multiângulo

SDS – Sódio dodecilsulfato

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

T1SS – Sistema de Secreção do Tipo I

T2SS – Sistema de Secreção do Tipo II

T3SS – Sistema de Secreção do Tipo III

T4P – Pilus do Tipo IV

T4SS – Sistema de Secreção do Tipo IV

T5SS – Sistema de Secreção do Tipo V
T6SS – Sistema de Secreção do Tipo VI
T7SS – Sistema de Secreção do Tipo VII
T8SS – Sistema de Secreção do Tipo VIII
T9SS – Sistema de Secreção do Tipo IX
T10SS – Sistema de Secreção do Tipo X
T11SS – Sistema de Secreção do Tipo XI
TAE – Tris-Acetato-EDTA
Tc^r – Resistente a tetraciclina
TC-U – Pilus Chaperona-Usher
Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tris-HCl – Solução de tris com pH ajustado pela adição de ácido clorídrico
X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
X-T4SS – *Xanthomonadales-like T4SS effectors*
X-Tfe – *Xanthomonadales-like T4SS effectors*
X-Tfi – *Xanthomonadales-like T4SS immunity proteins*
XVIP – *Xanthomonas VirD4 Interaction*
XVIPCD – *Xanthomonas VirD4 Interaction conserved domain*
WT – Selvagem

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1. O gênero <i>Xanthomonas</i>	15
1.1.1. <i>Xanthomonas citri</i> pv <i>citri</i>	15
1.2. Sistemas de Secreção Bacterianos.....	18
1.2.1. Sistema de secreção do tipo VI (T6SS).....	21
1.2.2. Sistema de secreção do tipo IV (T4SS).....	24
1.3. Sistema de secreção do tipo IV bactericida de <i>X. citri</i>	26
1.4. O par efetor/inibidor X-Tfe ^{XAC3266} /X-Tfi ^{XAC3267}	32
2. Objetivos.....	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos Específicos.....	37
3. Materiais e métodos.....	38
3.1. Clonagem gênica e técnicas de biologia molecular.....	38
3.1.1. Amplificação de reação em cadeia de polimerase (PCR).....	38
3.1.2. Clonagem de vetores de expressão gênica.....	41
3.2. Transformação de bactérias.....	45
3.2.1. Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	46
3.2.2. Transformação por eletroporação.....	47
3.3. Expressão heteróloga de proteínas em 2xTY.....	48
3.3.1. Expressão heteróloga de proteínas em meio ZYP-5052.....	49
3.4. Lise celular.....	50
3.4.1. Lise por prensa French.....	50
3.4.2. Lise por sonicação.....	51
3.5. Cromatografia de afinidade.....	51
3.5.1. Clivagem com trombina.....	52
3.6. Cromatografia de exclusão molecular.....	54
3.6.1. Determinação do estado oligomérico de proteínas.....	54
3.7. Curvas de crescimento microbiano.....	55
3.8. Ensaio de competição bacteriana.....	56
3.9. Ensaio de Translocação do efetor.....	59
3.9.1. Conceito de CRAFT.....	59
3.9.2. Ensaio de recombinação Cre-Lox por expressão heteróloga.....	62
3.9.3. Ensaio de translocação de recombinase Cre (CRAFT).....	63
3.10. Ensaio de ativação do sistema SOS de reparo de DNA.....	65
3.11. Microscopia de fluorescência.....	68

3.12. Ensaio de atividade nuclease por degradação de plasmídeos.....	69
3.13. Ensaio de atividade nuclease in vitro.....	70
4. Resultados.....	71
4.1. Desenho de um mutante no sítio ativo putativo de X-Tfe ^{XAC3266}	71
4.2. A expressão heteróloga de X-Tfe ^{XAC3266} afeta o crescimento de <i>E. coli</i>	72
4.3. X-Tfi ^{XAC3267} /X-Tfe ^{XAC3266} é um par efetor/inibidor do X-T4SS.....	76
4.4. X-Tfe ^{XAC3266} possui atividade nuclease e X-Tfi ^{XAC3267} é o seu inibidor.....	85
4.4.1. X-Tfe ^{XAC3266} ativa a resposta SOS de <i>E. coli</i>	85
4.4.2. X-Tfe ^{XAC3266} é capaz de degradar DNA plasmidial in vivo.....	88
4.5. Caracterização Bioquímica de X-Tfe ^{XAC3266} e X-Tfi ^{XAC3267}	90
4.5.1. Purificação de X-Tfe ^{XAC3266} e X-Tfi ^{XAC3267}	90
4.5.2. Determinação do estado oligomérico das proteínas.....	96
4.5.3. X-Tfe ^{XAC3266} é capaz de degradar DNA plasmidial <i>in vitro</i>	98
4.6. X-Tfe ^{XAC3266} é transportado para o citosol da célula receptora.....	100
5. Discussão.....	107
5.1. X-Tfe ^{XAC3266} é um efetor bactericida do X-T4SS.....	107
5.2. A atividade nuclease de X-Tfe ^{XAC3266}	111
5.3. Atuação de X-Tfe ^{XAC3266} no citosol de bactérias alvo/recipientes.....	112
6. Conclusão.....	117
7. Referências bibliográficas.....	119

1. Introdução

1.1. O gênero *Xanthomonas*

Xanthomonas é um gênero de bactérias Gram-negativas da classe *Gammaproteobacteria*. O nome do gênero é formado por duas palavras gregas; *xanthos*, que significa “amarelo” e *monas*, que significa “entidade”. Recebeu esse nome devido a pigmentação amarela, gerada pelo pigmento xantomonadina (HE; CAO; POPLAWSKY, 2020), característica dessas bactérias. O gênero geralmente apresenta forma de bastonete com um único flagelo polar, são aeróbias obrigatórias e têm uma temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C. Geralmente vivendo associadas a plantas, o gênero compreende 27 espécies que causam doenças graves em quase 400 plantas, incluindo uma ampla variedade de culturas importantes, como arroz, repolho e frutas cítricas (AN et al., 2020).

1.1.1. *Xanthomonas citri* pv *citri*

Entre os fitopatógenos do gênero *Xanthomonas* encontramos a bactéria *Xanthomonas citri* pv *citri* (antigamente *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*), organismo causador do cancro cítrico, uma doença que acomete cultivos de cítricos. A doença é caracterizada por lesões eruptivas em frutos, folhagens e caules jovens de plantas susceptíveis de citros, que causa manchas escuras, desfolha, redução da taxa fotossintética, ruptura da epiderme foliar. Quando a doença é severa, pode ocorrer desfolha, morte e queda dos frutos. Além disso, os frutos infectados que

permanecem são menos valiosos e, muitas vezes, não comercializáveis (SHAHBAZ et al., 2022).

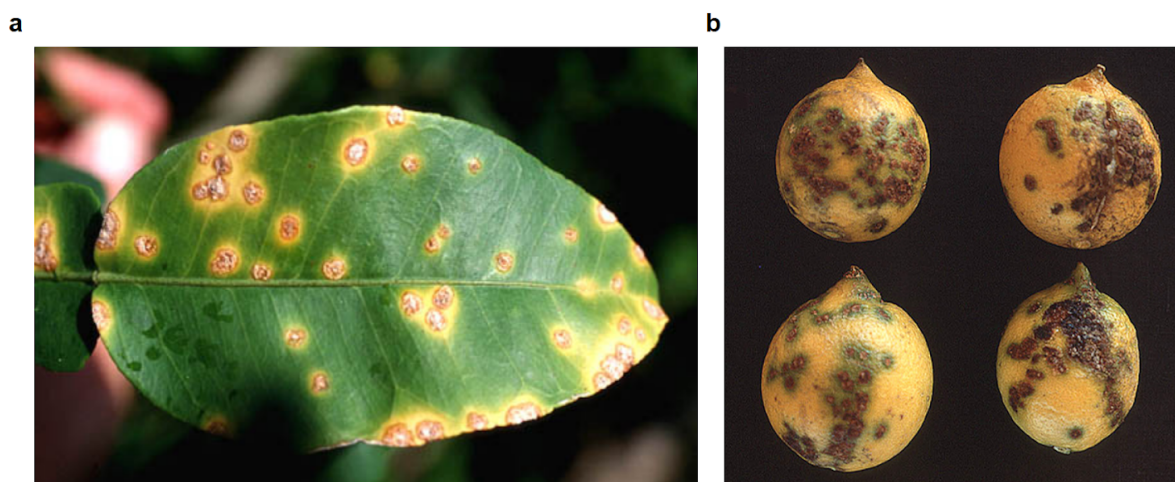


Figura 1: (a) Folha de toranja vermelha com lesões de cancro cítrico rodeadas por halos cloróticos. (b) Frutos de limão infectados com cancro cítrico (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002)

A bactéria causadora do cancro cítrico se propaga através de lesões em folhas, caules e frutos. Chuva e vento são os principais agentes de dispersão natural. Uma vez que atinge um novo hospedeiro, a bactéria penetra na planta através dos poros estomáticos ou feridas feitas por insetos ou por ferramentas usadas no cultivo. A partir das lesões, a bactéria invade os espaços intercelulares do apoplasto (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002; SHAHBAZ et al., 2022).

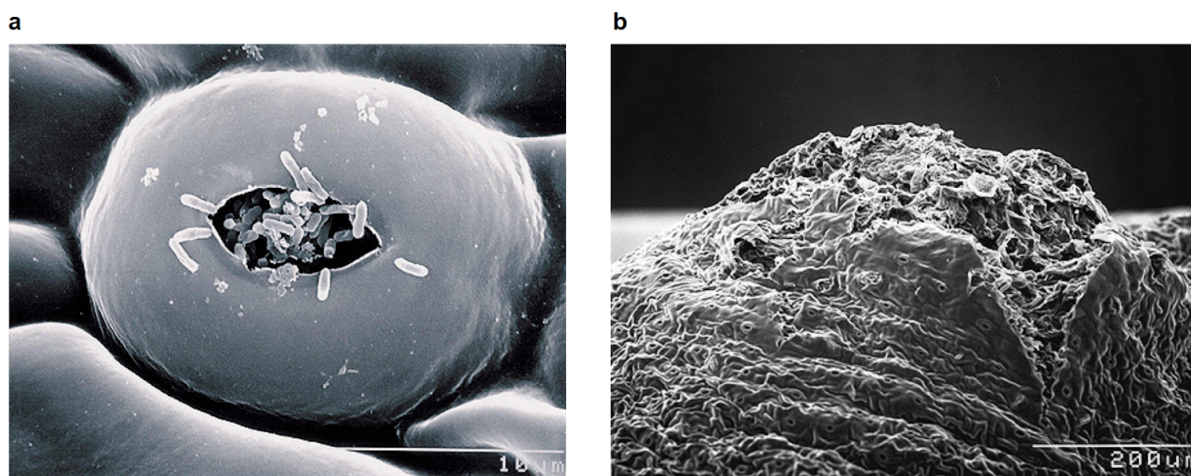


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura mostrando de plantas infectadas com *X. citri* (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002) **(a)** Estômatos em folha de toranja com bactérias de *X. citri* entrando na câmara estomática. **(b)** Erupção de lesão de cancro cítrico.

O cancro cítrico tem grande relevância econômica, pois reduz a produtividade do pomar, provoca perda da produção, além de restringir o uso dos cultivares altamente suscetíveis à doença, as chamadas variedades precoces. Em regiões onde a doença é endêmica é necessário um programa de manejo integrado para seu controle. No Brasil, a Instrução Normativa N°21 de 25/04/2018 (BRASIL, 2018) do Ministério da Agricultura estabelece as estratégias de controle da doença, que variam de acordo com o status fitossanitário da doença em uma região. As medidas que podem ser adotadas para isso incluem o uso de variedades resistentes, o estabelecimento de quebra-ventos, pulverização de bactericidas à base de cobre, desinfecção de ferramentas, aplicação indutores de resistência e controle do minador do citrus, inseto que provoca lesões na planta facilitando a entrada da bactéria. Apesar dessas medidas de controle não existe cura para a doença (SHAHBAZ et al., 2022).

Estima-se uma perda média anual de 20% na produtividade em culturas brasileiras não tratadas, que varia de acordo com a idade da planta. Sendo o Brasil o principal produtor mundial de laranja doce, a compreensão da biologia desse patógeno tem importância estratégica para o país (SANCHES et al., 2014).

Devido sua grande relevância econômica, muitos estudos têm sido feitos para entender a fisiologia e o comportamento desse fitopatógeno. A linhagem *Xanthomonas axonopodis citri* 306 teve seu genoma sequenciado e é o objeto de estudo para o desenvolvimento desta dissertação. Essa linhagem possui um cromossomo circular compreendendo 5.175.554 pares de bases (pb) e dois plasmídeos: pXAC33 (33.699 pb) e pXAC64 (64.920 pb) (DA SILVA et al., 2002).

O ciclo de vida da maioria das espécies de *Xanthomonas* abrange pelo menos 3 nichos: fora do hospedeiro, epifítico (na superfície de tecidos das folhas ou frutos da planta) e endofítico (colonizando a planta hospedeira). O estágio endofítico, no qual a bactéria infecta o hospedeiro, causando a doença, tem recebido maior atenção nos estudos com espécies patogênicas. Entretanto, nos outros estágios, a bactéria pode enfrentar diversos agentes estressores como variações de temperatura e umidade, escassez de nutrientes, radiação ultravioleta e competição contra outros organismos, incluindo outras bactérias. Os estudos dessas interações podem fornecer informações valiosas para o controle destes patógenos (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2020; AN et al., 2020).

Análises do genoma de *X. citri* mostram que essa bactéria possui repertório de mecanismos que habilitam o patógeno a sobreviver nesses ambientes adversos. Entre os mecanismos de sobrevivência de *X. citri* se encontram os sistemas de secreção bacterianos (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2020).

1.2. Sistemas de Secreção Bacterianos

Bactérias enfrentam uma grande variedade de condições hostis para colonizar com sucesso ambientes hospedeiros e não hospedeiros. Nesses habitats, estão em constante contato com outros organismos, como animais, plantas, fungos, protozoários e outros procariotos. Essa vasta rede de interações levou à evolução de uma gama diversificada de vias envolvidas na manipulação celular de hospedeiros eucariotos, na formação de biofilme e na capacidade de antagonizar procariotos competidores que disputam recursos no mesmo nicho (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2020; KLEIN; AHMAD; WHITNEY, 2020).

Dentre os mais sofisticados mecanismos de interação presente em bactérias estão os sistemas de secreção de macromoléculas. Esses sistemas de secreção são nanomáquinas dedicadas à transportar macromoléculas através de uma ou mais membranas celulares. Isto permite que bactérias possam transportar moléculas de alto peso molecular, como proteínas e DNA, para o meio externo ou para dentro de outras células (COSTA et al., 2015; GREEN; MECASAS, 2016). Coletivamente, esses sistemas transportam um repertório altamente diversificado de substratos proteicos, variando quanto ao tamanho, à carga elétrica dos resíduos, ao estado de enovelamento, ao estado de oligomerização, à presença de modificações pós-traducionais, ou mesmo à ligação covalentemente à moléculas de DNA (CHRISTIE, 2019).

Entre os sistemas de transporte de macromoléculas capazes de translocar proteínas através da membrana externa de bactérias, podemos destacar o sistema de biogênese de pilus Chaperona-Usher (C-U), o sistema de montagem de pilus do tipo IV (T4Ps) e 9 sistemas nomeados formalmente de sistemas de secreção dos tipos 1 a 9 (Figura 3): T1SS até T9SS (CHAGNOT et al., 2013). Também podemos citar sistema de secreção de proteína dependente de holina/peptidoglicano hidrolase, recém descoberto em *Serratia marcescens* e o sistema de secreção associado a simbiose encontrado em *Xenorhabdus nematophila*. Tem sido proposto que estes sistemas sejam denominados T10SS e T11SS, respectivamente (GROSSMAN et al., 2021; PALMER et al., 2021).

Os sistemas de secreção podem transportar substratos oriundos diretamente do citoplasma (T1SS, T3SS, T4SS e T6SS) ou oriundos do periplasma, necessitando ser previamente exportados para esse compartimento via sistema Sec ou Tat (T2SS, T5SS, T7SS, T9SS, TC-U e T4P) (BOCIAN-OSTRZYCKA et al., 2017;

CHRISTIE, 2019). Alguns desses aparatos podem, também, transportar substratos através da membrana de outra célula, permitindo injetar proteínas ou DNA diretamente na célula de um hospedeiro eucarioto ou de uma outra bactéria, como representado na figura 3 (GREEN; MECSAS, 2016).

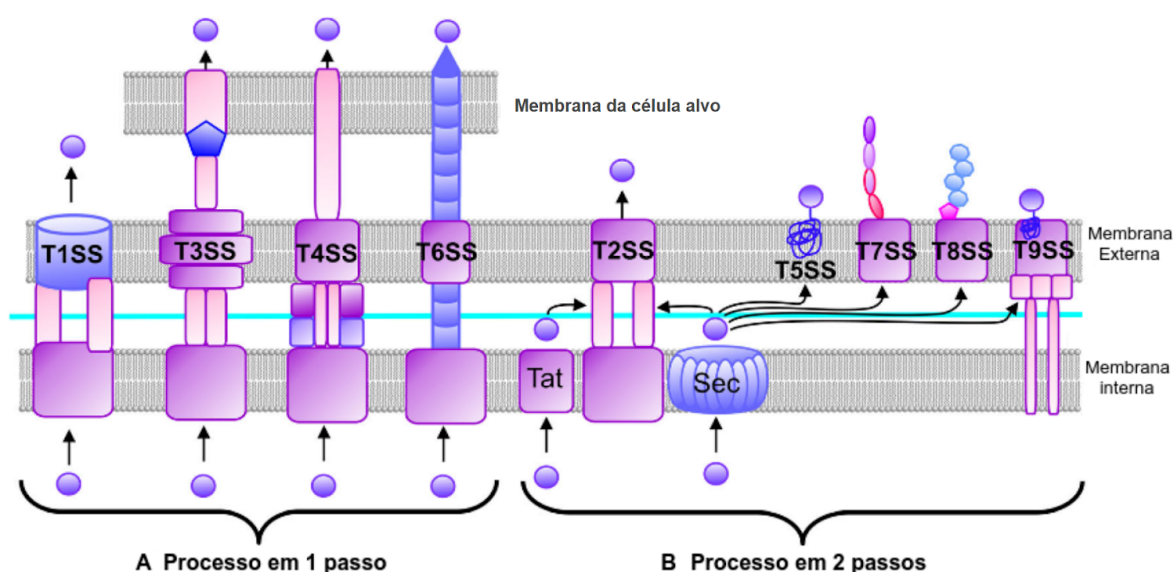


Figura 3: Sistemas de secreção de bactérias em bactérias Gram-negativas. Os sistemas de secreção estão divididos em A: sistemas de secreção em um passo (*T1SS*, *T3SS*, *T4SS* e *T6SS*) e B: sistemas de secreção em dois passos (*T2SS*, *T5SS*, *T7SS* e *T9SS*) (BOCIAN-OSTRZYCKA et al., 2017).

Certos sistemas transportam efetores com atividade antibacteriana. Desta forma, permitem que bactérias ganhem vantagem na competição microbiana, introduzindo proteínas tóxicas em bactérias concorrentes. Já foram reportados cinco sistemas envolvidos na secreção de efetores antibacterianos, os sistemas I, IV, V, VI e VII (KLEIN; AHMAD; WHITNEY, 2020). A compreensão desses sistemas ainda é limitada, entretanto todos eles têm três características em comum. Primeiro, todos os sistemas transportam toxinas antibacterianas chamadas de efetores através do envelope celular de forma dependente de ATP. Em segundo lugar, o gene de cada efector antibacteriano é codificado perto de um gene de uma proteína de imunidade cognata, que neutraliza os efeitos tóxicos do efector. Esta característica previne que a

célula se auto-intoxique e protege células irmãs de sofrerem fratricídio. Finalmente, os efetores antibacterianos, independente do sistema de secreção ao qual estão relacionados, degradam ou modificam componentes celulares essenciais, como membranas, peptidoglicano e ácidos nucleicos (KLEIN; AHMAD; WHITNEY, 2020).

Dos sistemas de secreção com atividade antibacteriana, os sistemas IV e VI são os únicos que foram reportados, até o momento, com capacidade de injetar toxinas diretamente em bactérias alvo. Para isso, transporta seus efetores através de múltiplas membranas. Esse mecanismo de entrega de toxina pode ter evoluído porque as toxinas entregues dessa maneira são menos propensas a efeitos de diluição que podem reduzir a eficácia de moléculas antibacterianas difusíveis em ambientes aquosos (BENZ; MEINHART, 2014; KLEIN; AHMAD; WHITNEY, 2020; SOUZA et al., 2015).

1.2.1. Sistema de secreção do tipo VI (T6SS)

O sistema de secreção do tipo VI é um sistema de injeção contrátil que secreta efetores nas células-alvo usando um mecanismo reminescente de bacteriófagos de cauda contrátil. O aparelho funciona de forma similar a uma mola para translocar efetores através do envelope celular e nas células-alvo. Embora os T6SSs sejam mais frequentemente descritos como sistemas de injeção intracelular, há evidências que esses sistemas podem transportar efetores para o meio extracelular. Esses efetores se ligam a metais atuando na aquisição desses íons do ambiente (CHRISTIE, 2019)

T6SSs são montados a partir de cerca de 20 proteínas. Os principais componentes incluem uma bainha (TssBC) que envolve um tubo ou agulha (Hcp). O

tubo possui um complexo em sua ponta (VgrG) que perfura a membrana da célula-alvo. O complexo tubo/bainha é montado em uma plataforma denominada placa de base, um grande complexo (VgrG/TssK/E/F/G) que ancora o complexo tubo/bainha ao complexo de membrana e também orienta o tubo/bainha em relação ao envelope celular. A placa de base se conecta a um complexo de membrana composto de TssJ/M/L, que abrange todo o envelope celular e forma o canal através do qual o tubo passa após a contração da bainha. Um esquema geral do T6SS pode ser observado na Figura 4 (CHRISTIE, 2019).

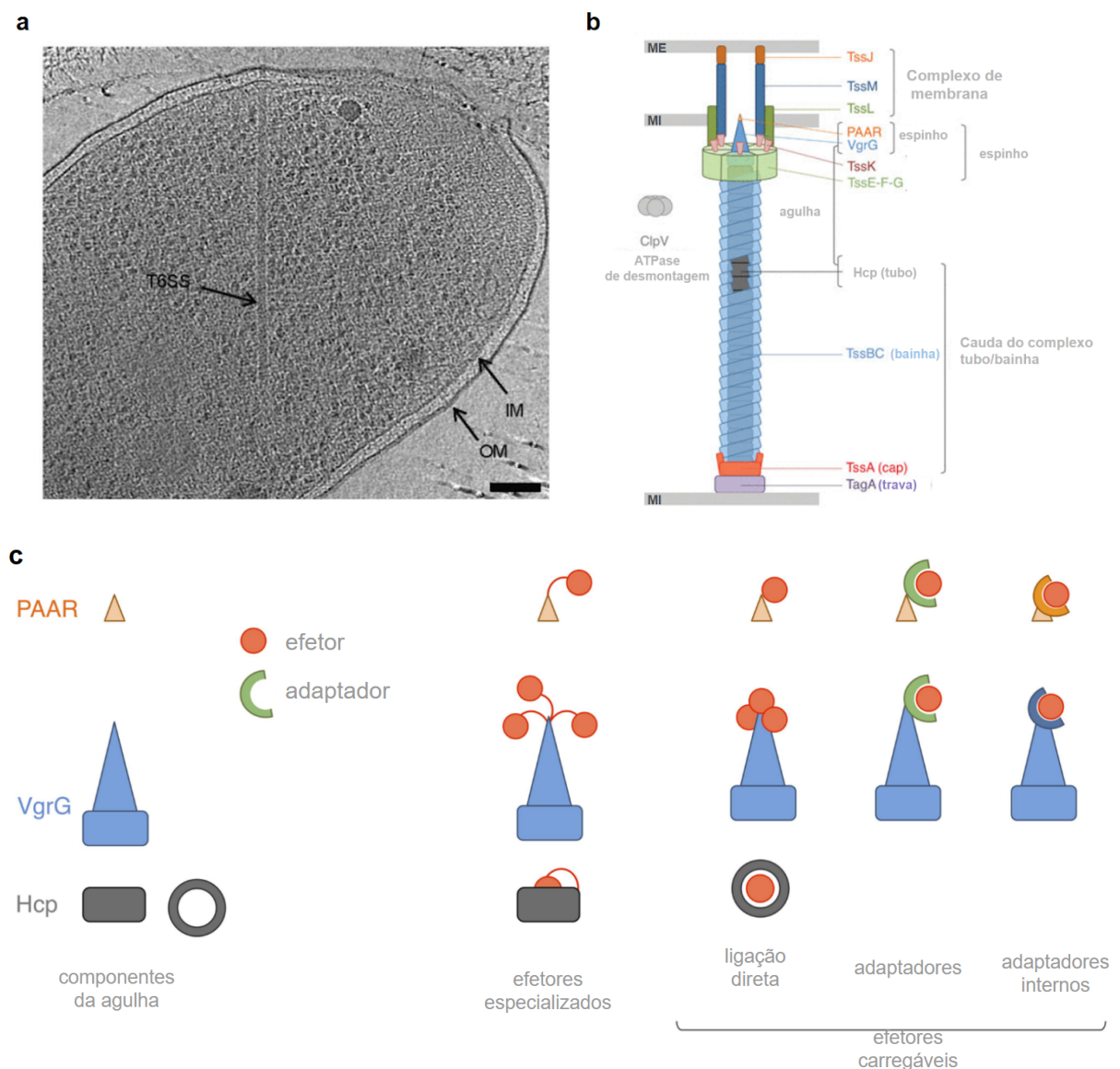


Figura 4: Sistema de secreção do tipo VI (T6SS). **(a)** Tomografia de célula de *V. cholerae* com T6SS se projetando até 1 μ m no citoplasma (BASLER; MEKALANOS, 2012;

UMREKAR et al., 2021). **(b)** Representação esquemática do T6SS e seus componentes (CHERRAK et al., 2019). **(c)** Representação esquemática dos mecanismos de carregamento de efetor no T6SS. Os efetores são representados como círculos laranjas. Efetores especializados são quimeras de VgrG fusionadas ao efetor. Os efetores de carregamento são proteínas independentes que se associam aos componentes da agulha (Hcp, VgrG e PAAR). A ligação de efetores de carregamento a componentes de agulha pode ser direta ou mediada por adaptadores que são proteínas independentes ou adaptadores internos, que são extensões de VgrG e PAAR (CHERRAK et al., 2019).

Existe cinco maneiras conhecidas pelas quais os efetores são secretados por meio dos T6SSs (Figura 4c): (i) dentro do lúmen dos hexâmeros Hcp, (ii) como extensões C-terminais de Hcp, (iii) através da interação com proteínas VgrG, (iv) como extensões C-terminal de proteínas VgrG, e (v) como extensões C-terminal de proteínas contendo repetição PAAR (KLEIN; AHMAD; WHITNEY, 2020).

Um grande número de efetores antibacterianos do T6SS foram identificados. Alguns desses sistemas secretam apenas um efetor, enquanto outros podem secretar uma mistura de efetores com atividades diferentes, que atuam de forma sinérgica (LACOURSE et al., 2018). Em geral, a atividade dos efetores antibacterianos T6SS pode ser subdividida em toxinas líticas que exercem sua atividade em componentes do periplasma da bactéria alvo e toxinas ativas em componentes do citoplasma dessas células. Entre as proteínas líticas podemos encontrar proteínas com atividade peptidoglicano-hidrolase (amidase, glicosídeo-hidrolase, lisozima e metalo-peptidase), despolarizadoras de membrana e fosfolipases. Entre as toxinas que atuam no citosol da célula alvo foram identificadas proteínas com atividade DNases, NAD(P)⁺ hidrolases, (p)ppApp-sintetases e ADP-ribosil-transferases (JURÉNAS; JOURNET, 2021; KLEIN; AHMAD; WHITNEY, 2020).

O mecanismo pelo qual a maioria das toxinas citoplasmáticas do T6SSs alcança o citoplasma da de bactérias Gram-negativas não é conhecido. Uma vez que o sistema é capaz de perfurar a membrana externa de forma mecânica, é

possível que alguns desses efetores sejam secretados diretamente no citoplasma de bactérias competidoras através da perfuração da membrana interna. Entretanto, algumas toxinas utilizam domínios específicos que promovem a translocação através da membrana interna do alvo. Recentemente foi demonstrado que Tde1, um o efector do T6SS de *Agrobacterium tumefaciens* com domínio DNase, é capaz de se translocar através da membrana interna de uma célula alvo (ALI et al., 2023).

1.2.2. Sistema de secreção do tipo IV (T4SS)

Dentre os sistemas de secreção de bactérias, talvez os mais versáteis sejam os sistemas de secreção do tipo IV (T4SS). Para classificar os vários T4SSs, diversos critérios foram propostos. Inicialmente eram classificados de acordo com o tipo de plasmídeo que os codifica. Com a descoberta de sistemas codificados no genoma de bactérias foi necessário expandir as formas de classificação. Dependendo do objetivo do estudo, os T4SSs podem ser classificados quanto à estrutura do sistema ou quanto à função que exerce. Do ponto de vista funcional, os T4SSs são classificados em quatro grupos: os sistemas conjugativos, os sistemas que translocam efetores, os sistemas que liberam e capturam DNA do meio e o, recentemente descoberto, sistema antibacteriano (ALVAREZ-MARTINEZ; CHRISTIE, 2009; CHANDRAN DARBARI; WAKSMAN, 2015; SOUZA et al., 2015). Essa classificação é construída de acordo com a finalidade do T4SS e depende diretamente dos substratos transferidos e dos organismos nos quais estes substratos são secretados.

O sistema conjugativo é o T4SS mais comum, sendo encontrado na maioria das bactérias e algumas *Archaea*. Esse sistema é responsável pelo transporte de

DNA direto para outra célula bacteriana, promovendo conjugação. É o principal responsável pela transferência horizontal de genes, sendo muito estudado devido sua relação com disseminação de resistência à antibióticos. São codificados por plasmídeos conjugativos ou por transposons conjugativos, que depois são transportados pelo próprio T4SS juntamente com a maquinaria necessária para o processamento do DNA transferido. Essa maquinaria é composta por proteínas relaxases covalentemente ligadas a DNA simples-fita. (CHANDRAN DARBARI; WAKSMAN, 2015; GALÁN; WAKSMAN, 2018).

O segundo grupo mais comum é o T4SS que transloca efetores em uma célula eucariótica. Essas proteínas modulam a função celular do hospedeiro eucarioto facilitando o processo de colonização. São essenciais para a virulência de diversas bactérias patogênicas, como *Legionella spp.*, *Brucella spp.*, *Coxiella spp.*, *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens*, entre outras (GALÁN; WAKSMAN, 2018).

O terceiro grupo de T4SS é capaz de trocar DNA com o meio extracelular, ou seja, sem contato direto com outras células. São conhecidos sistemas capazes de captar DNA do meio, como o presente em *Helicobacter pylori*, e sistemas capazes de secretar DNA para o meio extracelular como o de *Neisseria gonorrhoeae* (ALVAREZ-MARTINEZ; CHRISTIE, 2009).

Por fim, temos o T4SS bactericida. Este sistema transporta efetores com atividade antibacteriana em bactérias gram-negativas e foi descoberto no fitopatógeno *X. citri* (SOUZA et al., 2015).

1.3. Sistema de secreção do tipo IV bactericida de *X. citri*

Xanthomonas citri possui pelo menos um subtipo de cada um dos sistemas de secreção do tipo I, II, III, IV, V e VI (T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T5SS e T6SS) (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2020). Esses sistemas permitem que bactéria se adapte a diversas condições ambientais, dentro e fora da planta hospedeira. Quando não se encontra no estágio endofítico, *X. citri* conta com um sistema de secreção do tipo IV especializado em matar bactérias (SGRO et al., 2019).

Os primeiros trabalhos sobre o T4SS codificado no cromossomo de *X. citri*, apontaram que o sistema, embora apresentasse todos os componentes estruturais canônicos de T4SS conjugativo, não possuía genes que codificam homólogos dos componentes do relaxossomo que processam DNA (ALEGRIA et al., 2005). Também foi descartada a participação direta do sistema de secreção no desenvolvimento de cancro cítrico uma vez que a deleção de componentes estruturais essenciais do sistema não afetam o desenvolvimento de sintomas da doença (SOUZA et al., 2011).

Através de ensaios de duplo híbrido contra uma biblioteca de presas derivada de todo o genoma de *X. citri*, foi possível identificar 12 proteínas que interagiram com a proteína de acoplamento VirD4, uma ATPase do T4SS associada à membrana interna que reconhece os substratos a serem secretados. As proteínas que interagiram com VirD4 foram chamadas de *Xanthomonas VirD4 Interaction proteins (XVIPs)*. Todas essas proteínas contêm um domínio C-terminal conservado de aproximadamente 120 resíduos denominado *XVIP conserved domain* ou *XVIPCD* (ALEGRIA et al., 2005). Estudos posteriores demonstraram que os XVIPCDs podem ser divididos em duas regiões com funções distintas, ambas necessárias para que

ocorra a secreção: a região N-terminal bem enovelada contém motivos conservados que são responsáveis por interações com VirD4, (OKA et al., 2022).

Análises de bioinformática foram capazes de apontar as possíveis atividades de domínios presentes em 8 XVIPs. Entre os domínios identificados, foram encontrados domínios com atividade associada a degradação da parede celular bacteriana, sugerindo que T4SS codificado no genoma de *X. citri* teria atividade bactericida. Estudos posteriores mostraram que as XVIPs são secretadas pelo T4SS no periplasma de outras bactérias Gram-negativas, provocando a morte dessas células (SOUZA et al., 2015). Também foi demonstrado que o domínio XVIPCD é o sinal de secreção pelo qual a proteína de acoplamento reconhece os efetores que serão secretados. (SOUZA et al., 2015). Esse T4SS foi chamado de *Xanthomonadales-like Type IV secretion system* ou X-T4SS e os efetores foram chamados de *Xanthomonadales-like T4SS effectors* ou X-Tfe (SGRO et al., 2019; SOUZA et al., 2015).

Foi possível identificar X-Tfes em muitas espécies de *Xanthomonas*, bem como outras da ordem *Xanthomonadales* dentro da *Gammaproteobacteria* e algumas outras famílias dentro da *Betaproteobacteria* (Sgro et al, 2019). Até agora, todas as espécies que carregam um X-T4SS homólogo também codificam potenciais X-Tfes com domínios XVIPCD (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2020; SGRO et al., 2019).

A predição das atividades enzimáticas presentes no X-Tfes revelou domínios com atividade transglicosilase lítica, peptidoglicano glicohidrolase, metalopeptidase, peptidase, lipase e lisozima (Figura 5b). Sendo que 7 X-Tfes teriam função tóxica quando injetadas no periplasma pois tem como alvo componentes da parede celular (X-Tfe^{XAC3634}, X-Tfe^{XAC2609}, X-Tfe^{XAC0466}, X-Tfe^{XAC0096} e

C

X-Tfe	X-Tfi	Sequência de aminoácidos no N-terminal de X-Tfi
XAC3634	XAC3633	MLV <u>RLKISLVLALAT</u> IAACT QTQATPDATAAPKTA AAAAAGTP TKPSEKDASPM...
XAC2609	XAC2610	MLT <u>RELARAVAGVIYLICVVS</u> ITAC SPSNAPSAEADGEKSPAKNQASKKPEYELQKDLKM...
XAC0466	XAC0467	MPPF <u>RLLIPIILAVAL</u> VAC NGPQAADAPETPANAPAAAAQPPSPAASPPATPTQGTVPM...
XAC0096	XAC0097	MRFP <u>RAALLFLTALCAPALS</u> SAC AHGPLKPLPKEHADM...
XAC0574	XAC0573	MAAHL <u>PRRPAR</u> RQML TPSLLALL L TACHSPETSM...
XAC2885	XAC2884	MQP <u>RFPALLVLATSFF</u> AVSC TASPGAKEQTM...
XAC1918	XAC1917	MK <u>IKSVGCVALALFF</u> ITGC TVVSAGADM...

Figura 5: X-Tfes de *X. citri* e suas respectivas proteínas imunes putativas X-Tfis. **(a)** perfil de conservação de sequência da região N-terminal do XVIPCD, derivado de 4.750 sequências não idênticas obtidas do banco de dados de proteínas não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (OKA et al., 2022). **(b)** Nomes de genes e arquiteturas de domínio das X-Tfes. PGB: domínio de ligação ao peptidoglicano; GH19: glicohidrolase da família 19; SLT: transglicosilase lítica solúvel; Ca²⁺: domínio de ligação Ca²⁺; AHH: domínio de nuclease putativo; XVIPCD: domínio de interação com VirD4 (SOUZA et al., 2015). **(c)** Pares X-Tfe/X-Tfi de *X. citri* nos quais se prevê que o X-Tfi seja uma lipoproteína. A terceira coluna apresenta a sequência de aminoácidos N-terminal do X-Tfi. A sequência sinal e o Lipobox são mostrados em negrito, os nucleotídeos básicos no N-terminal da sequência sinal são mostrados em azul e os quatro resíduos do Lipobox são mostrados em vermelho. Os resíduos sublinhados mostram a região entre o resíduo Cis absolutamente conservado no local de clivagem no Lipobox e próximo resíduo Met (verde) na sequência da proteína.

Como os efetores do T4SS são tóxicos para *X. citri*, o DNA da bactéria codifica, a montante de cada efetor, um ou mais genes para proteínas de imunidade, que inibe a atividade tóxica do X-Tfe cognato, conjunto efetor(es)/inibidor(es). Essas proteínas foram chamadas de *Xanthomonadales-like T4SS immunity proteins* ou X-Tfis (SOUZA et al., 2015). Análises de Bioinformática mostraram que as proteínas que inibem os X-Tfes com possível ação periplasmática possuem um peptídeo sinal de lipoproteínas e um lipobox (Figura 5c). Tais estruturas indicam que essas proteínas migram para o periplasma e se ancoram na membrana da célula, protegendo a própria *X. citri* da ação tóxica da X-Tfe periplasmática correspondente. Também foi observado que esse grupo X-Tfis possui em seus genes potenciais códons de iniciação (ATG) alternativos com sítios de ligação de ribossomo associados a jusante do sítio lipobox (Figura 5c). Isso levanta a possibilidade de que muitos X-Tfes possam ser produzidos em duas versões: (i) uma lipoproteína

periplasmática associada à membrana e (ii) uma proteína citosólica solúvel. Desta forma, a versão periplasmática do inibidor protegeria a célula de possíveis vazamentos do efetor para o periplasma e do ataque de bactérias irmãs, enquanto a versão citosólica do inibidor protegeria a célula de efetores que também pudessem causar dano a partir do citosol, como fosfolipases. Já o inibidor da putativa nuclease X-Tfe^{XAC3266}, não apresenta característica de lipoproteína, nem códon de iniciação alternativo com sítios de ligação de ribossomo associado. Isto reforça a hipótese de que se trata de um efetor de ação citoplasmática (SGRO et al., 2019; SOUZA et al., 2015). Uma representação esquemática da possível ação dos efetores e inibidores do X-T4SS pode ser vista na Figura 6.

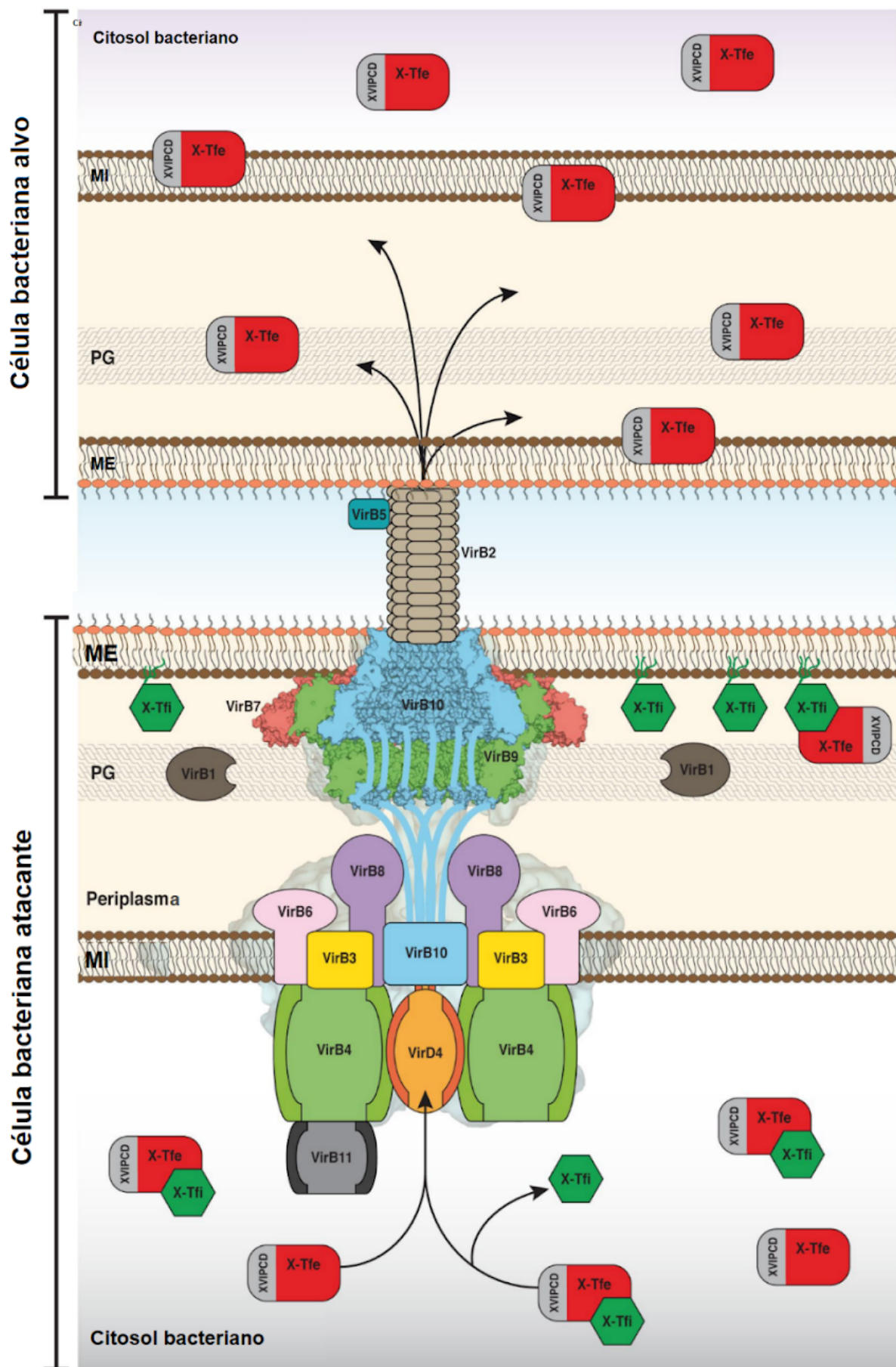


Figura 6: Modelo esquemático da estrutura e função dos sistemas de secreção de tipo IV semelhantes a Xanthomonadales (X-T4SSs). O modelo mostra a interface entre duas células bacterianas. A célula atacante (abaixo) está armada com um X-T4SS. Os efetores X-Tfes interagem, por meio de seus domínios XVIPCD, com VirD4 e são secretados para a célula alvo, onde irão degradar estruturas alvo. Proteínas de imunidade X-Tfi com ação periplasmática se ancoram na membrana externa da célula atacante prevenindo danos causados pelos efetores de células irmãs ou pelo vazamento de um efector endógeno para o periplasma. Antes da secreção, os X-Tfes cujas atividades podem atingir substratos citosólicos podem ser inibidos por variantes citosólicas de suas proteínas de imunidade cognata, X-Tfis (SGRO et al., 2019).

Em trabalhos anteriores do prof. Dr. Shaker Chuck Farah, foi demonstrado que cepas de *X. citri* mutantes que não possuem todos os pares X-Tfe/X-Tfi (*X. citri* Δ9) não tem a capacidade de matar bactérias numa maneira dependente do X-T4SS (OKA et al., 2022). Além disso, foi experimentalmente confirmada a atividade de todos efetores, com exceção de X-Tfe^{XAC0096} e X-Tfe^{XAC3266}. Também foi demonstrado o papel inibitório dos X-Tfi cognatos a todos os efetores com exceção ao inibidores de X-Tfe^{XAC0466} e X-Tfe^{XAC3266} (BUENO, 2018; OKA et al., 2022; SOUZA et al., 2015). O presente projeto se propõe a realizar a caracterização funcional do efector X-Tfe^{XAC3266} X-T4SS de *Xanthomonas citri* e de seu possível inibidor X-Tfi^{XAC3267}.

1.4. O par efector/inibidor X-Tfe^{XAC3266}/X-Tfi^{XAC3267}

O efector X-Tfe^{XAC3266} é uma proteína com 861 aminoácidos e massa molecular teórica de 92,5 kDa, sendo o maior X-Tfe codificado pelo genoma de *Xanthomonas citri*. Análises de bioinformática no banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) apontam a presença de um domínio AHH que pertence à superfamília de endonucleases HNH/ENDO VII (ZHANG; IYER; ARAVIND, 2011).

Membros desse domínio contém 4 histidinas conservadas das quais, a primeira liga a um íon metálico e as outras três estão envolvidas na ativação de uma

molécula de água para hidrólise (ZHANG; IYER; ARAVIND, 2011). No X-Tfe^{XAC3266}, o domínio AHH corresponde ao trecho do aminoácido 6 ao 90, enquanto o domínio XVIPCD está localizado entre os aminoácidos 735 e 861 como é possível observar na Figura 7a (SOUZA et al., 2015).

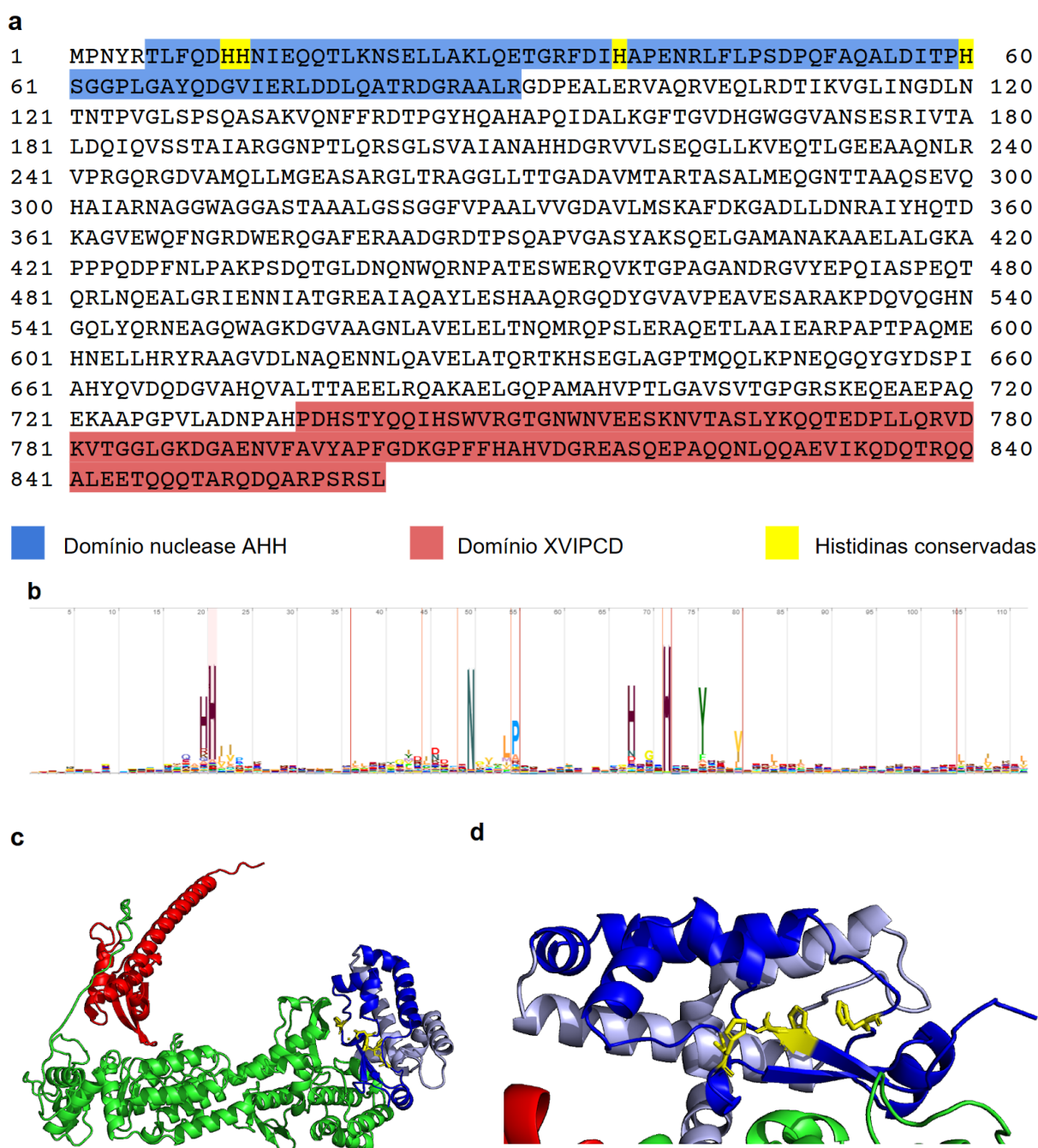


Figura 7: X-Tfe^{XAC3266} (a) Sequência dos aminoácidos de X-Tfe^{XAC3266} e seus domínios preditos. Em azul, domínio nuclease AHH com as 4 histidinas conservadas (H12, H13, H37 e H60) em amarelo; em vermelho, o domínio XVIPCD, responsável pelo reconhecimento pela VirD4. (b) Logotipo com assinatura do domínio AHH extraída do banco de dados *Uniprot*. (c) Predição da estrutura terciária de X-Tfe^{XAC3266} retirado do banco de dados

AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). O domínio XVIPCD está marcado em vermelho, o motivo que define o domínio nuclease em azul se encontra dentro de um domínio globular maior predito pela que vai entre aminoácidos 91 até 159 representado em azul claro. As histidinas 12, 13, 37 e 60 estão mostradas em amarelo com suas cadeias laterais (**d**) Domínio AHH em destaque com as histidinas em amarelo.

Toxinas da família AHH são preditas de ser encontradas em diversos filos de bactérias: *actinobacteria*, *αβγδE-proteobacteria*, *bacteroidetes*, *cyanobacteria*, *firmicutes*, *fusobacteria*, *lentisphaerae*, *planctomycetes*, *spirochaetes*, *verrucomicrobia*; além de eucariotos: subfilo *hexapoda*; e vírus: *Ostreococcus lucimarinus virus*, *sp. RCC1105 virus*. Também é predito estarem associados a pelo menos 5 sistemas de secreção bacterianos: T2SS, X-T4SS, T5SS, T6SS e T7SS (SGRO et al., 2019; ZHANG et al., 2012).

Poucos efetores da família AHH foram caracterizados até o momento e todos os exemplos referem-se a efetores de T6SSs. Foi demonstrado que a expressão heteróloga do efector com com domínio AHH codificado pelo gene PCBA_RS22965 do T6SS de *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* 1692 tem efeito tóxico sobre o crescimento de *E. coli*, e que a expressão conjunta do gene do inibidor (PCBA_RS08690) restaura o crescimento (BELLIENY-RABELO et al., 2019). Também foi mostrado que a efector Rhs2 do T6SS de *A. baumannii* AB307-0294 possui um domínio AHH na região C-terminal e apresenta capacidade de matar bactérias competidoras via T6SS, capacidade que é abolida pela ação do inibidor RhsI. Verificou-se que o lisado celular de uma cultura de *E. coli* expressando de forma heteróloga a região C-terminal do efector foi capaz de degradar DNA *in vitro* (FITZSIMONS et al., 2018). Por fim, podemos citar o par efector inibidor V2a/V3a do T6SS de *Agrobacterium tumefaciens* 1D1609. O efector possui domínio AHH C-terminal e é capaz de matar *E. coli* via o T6SS. A atividade DNase desse efector foi

demonstrada pela degradação de plasmídeos *in vivo* após a expressão heteróloga do efetor em *E. coli* (SANTOS et al., 2020).

Por se tratar de uma provável nuclease, espera-se que X-Tfe^{XAC3266} tenha como alvo ácido nucléico no citoplasma da célula recipiente, diferente dos demais efetores do X-T4SS de *X. citri* que tem como alvo componentes da membrana ou da parede celular bacteriana. Por conta disso, levantamos a hipótese de que X-Tfe^{XAC3266}, ao ser injetada no periplasma da bactéria alvo, seja translocada para o citoplasma. Além da provável ação no citoplasma, X-Tfe^{XAC3266} tem uma região central sem domínio predito (Figura 7), cuja extensão de 645 aminoácidos supera a extensão completa dos outros XVIPs. É possível especular que essa região central da proteína poderia conter um ou mais domínios ou motivos estruturais que conferem ao efetor a capacidade de se translocar pela membrana interna da célula alvo.

Diversos efetores bactericidas apresentaram atividade tóxica dependente da presença do efetor no citosol da célula alvo. Levantando a questão de como esses efetores atravessam a membrana interna de bactérias Gram-negativas. Já foi demonstrado que alguns efetores do T6SS podem se translocar através da bicamada lipídica. O efetor Tse6 de *Pseudomonas aeruginosa* é uma NAD(P)⁺ hidrolase que atua no citoplasma de células competidoras. Tse6 possui duas regiões contendo domínios transmembranas que se inserem na bicamada lipídica permitindo a translocação do domínio tóxico (QUENTIN et al., 2018). O efetor Tde1 de *Agrobacterium tumefaciens* possui um domínio C-terminal Ntox15 DNase com um motivo catalítico HxxD conservado. Tde1 possui, na região N-terminal, cópias contínuas de motivos GxxxG semelhantes à estrutura de zíper de glicina encontrada em proteínas envolvidas na formação de canais de membrana (ALI et al., 2023). Os

dados apresentados sugerem que os motivos GxxxG governam a entrega de Tde1 no citosol de bactérias gram-negativas competidoras ao permeabilizar a membrana citoplasmática da célula alvo.

Esses dados sugerem que outros efetores antibacterianos que possuem domínios que atuam no citosol, como X-Tfe^{XAC3266}, podem possuir domínios que promovam sua translocação através da membrana interna das células alvo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterização funcional do efetor X-Tfe^{XAC3266} do sistema de secreção do tipo IV de *Xanthomonas citri*, e seu inibidor cognato X-Tfi^{XAC3267}.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar se X-Tfe^{XAC3266} é um efetor do sistema de secreção do tipo IV de *Xanthomonas citri*.
- Determinar se X-Tfe^{XAC3266} confere vantagem à *X. citri* em competição dependente de contato.
- Caracterizar a possível atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266} *in vitro* e *in vivo*.
- Averiguar, através de ensaios bioquímicos e funcionais, *in vitro* e *in vivo*, se X-Tfi^{XAC3267} é o inibidor cognato de X-Tfe^{XAC3266}.
- Avaliar se X-Tfe^{XAC3266} é capaz de se localizar no citosol de uma célula alvo.

3. Materiais e métodos

3.1. Clonagem gênica e técnicas de biologia molecular

3.1.1. Amplificação de reação em cadeia de polimerase (PCR)

A partir da sequência do genoma de *X. citri* linhagem 306 (DA SILVA et al., 2002), foram desenhados oligonucleotídeos, visando a amplificação de diferentes construções das proteínas de interesse. O processo foi feito usando o programa *NEBuilder Assembly Tool* (<https://nebuilder.neb.com/#/>) que, além de sugerir as sequências dos oligonucleotídeos, também forneceu as temperaturas de fusão (T_m). As sequências dos genes foram amplificadas por reação de cadeia polimerase (PCR).

Para a clonagem dos genes do efetor e seu inibidor, foram desenhados pares de oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*) baseados na sequências dos genes de X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfi^{XAC3267}, para serem usados como *primers* na reação de polimerização. Nas extremidades 5' e 3' desses oligonucleotídeos foram adicionados nucleotídeos correspondentes à sequência das extremidades dos plasmídeos onde os genes seriam inseridos, visando clonagem pelo método de *Gibson Assembly* (GIBSON et al., 2009). Para a produção do mutante X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} foram usados primers *forward* e *reverse*, contendo uma alteração na base 36 do gene, alterando uma citosina para uma guanina, mutação que alteraria a histidina 12 (conservada) para uma glutamina. Os oligonucleotídeos com a mutação foram usados para amplificar o gene nas porções anteriores e posteriores ao sítio de mutação com sobreposição da região ao redor da mutação para a, subsequente, clonagem. Já

para a produção das quimeras proteicas do efector com a recombinase Cre, foram desenhados *primers forward* e *reverse* complementares à proteína X-Tfe^{XAC3266} com as extremidades nas posições 99 (5') e 861 (3'), respectivamente. Nessas extremidades, foram adicionadas sequências reconhecidas por enzimas de restrição *XhoI*, para clonagem por ligação de extremidades coesivas. Os primers utilizados em todas as reações estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos usados para clonagem em vetores de expressão

Nome do primer	Sequência (5'-3')
Primers para clonagem em pBRA	
F_3266_rev_pBra	GCTAGCAGGAGGAATTCACCatgccgaactatcggacg
F_3267_rev_pBra	GCTAGCAGGAGGAATTCACCatggaaacgaagacgatc
R_3267_fwd_pBra	ATAAAGCCCTGCAGGTCGACtcaacggttactactacgtc
R_3266_fwd_pbra	CAAGCATAAAGCCCTGCAGGTCGACttacagcgaccggcttgg
F_Cre_rev_pBRA	GGCTAGCAGGAGGAATTCACCatggcttccaatttactgaccgtacac
F_3266(13-861)_rev_Cre	AGATGGCGATAacattgaacagcagacgc
F_3266(99)_ACTG_XhoI	catCTCGAGGTTGCCAGCGTGTGG
R_3266_XhoI	agagctcgagttaCAGCGACCGGCTTGG
Primers para clonagem em pET28a	
F_3266_rev_pET28a	TGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGccgaactatcggacg
F_3267_rev_pET28a	TGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGgaaacgaagacgatc
R_3267_fwd_pET28a	CCACCAGTCATGCTAGCCATtcaacggttactactacgtc
R_3266_fwd_pET28a	CCACCAGTCATGCTAGCCATggccggctggcccagctc
Primers para mutação sítio dirigida	
F_3266(His-2-128) H12Q	gcttttcaagatcacca G aacattgaacagcagacg
R_3266(His-2-128) H12Q	cgctctgctgttcaatgttgggt C atcttgaaaaagc
Primers para confirmação de <i>Knockout</i> gênico	
F_3267_conf_KO	GTTGACACCCATATGGA
R_3266_conf_KO	AAGGAGCTTCACGACC

As reações de amplificação foram realizadas utilizando a enzima DNA polimerase *Phusion High Fidelity* (*Thermo Scientific*). De acordo com as especificações do manual da enzima, foram usados 10 µl de tampão *High Fidelity*

5x, adicionados os quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) a 0,2 mM cada, 0,5 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 5 ng de DNA genômico de *X. citri*, e água milli-Q até o volume de 50 μ l. As reações foram feitas em termociclador seguindo a programação apresentada na Tabela 2, e as temperaturas de anelamento (T_a) foram determinadas em 5°C abaixo da temperatura de *melting* fornecida pelo programa *NEB builder*.

Tabela 2: Parâmetros usados nas reações de PCR

Etapa de Reação		Temperatura (°C)	Tempo de Reação
Desnaturação inicial		98	30 s
30 ciclos	Desnaturação	98	7 s
	Anelamento	$T_a = T_m - 5$	30s
	Extensão	72	30s/kb
Extensão Final		72	7 min

Os amplicons gerados foram purificados usando eletroforese em gel de agarose a 1%, composto de 0,5 g de agarose em 50 ml de tampão tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e 5 μ l de corante de DNA Sybr Safe (Thermo Scientific). Em sequência, os amplicons foram extraídos usando um kit comercial de extração de gel da Thermo Scientific™ (GeneJET Gel Extraction Kit).

3.1.2. Clonagem de vetores de expressão gênica

Os produtos de PCR foram clonados usando a técnica de Gibson Assembly, em vetor pBRA (Figura 9), derivado do pBAD24 e produzido por Miryan Marroquin

(SOUZA et al., 2015), e pET28a (Novagen, Figura 8) O vetor pBRA foi clivado com as enzimas de restrição *NcoI* e *Sall* e o vetor pET28a com *XhoI* e *NdeI* (Thermo Scientific). Os plasmídeos foram purificados e extraídos usando a mesma metodologia que os amplicons. A reação de clonagem foi realizada usando o *Gibson Assembly Master Mix* (New England Biolabs). Para os ensaios com recombinase Cre, o amplicon da construção de X-Tfe^{XAC326699-851} foi clonado no plasmídeo pBRA-Cre cedido pela Dra. Cristina Alvarez-Martinez. O plasmídeo foi clivado com *Sall* e o amplicon com *XhoI*, visto que as duas enzimas geram extremidades complementares, que quando ligadas não apresentam sítio de clivagem para enzimas de restrição. A clonagem foi realizada por reação de ligase entre as extremidades coesivas, como mostrado na Figura 10. Para todas as clivagens foram usadas enzimas *Fast digest* (Thermo Scientific). As reações foram realizadas conforme o especificado no manual de cada enzima, e em todas as reações de clivagem de plasmídeos, foi adicionada fosfatase alcalina, para impedir a re-ciclagem do vetor. Em seguida, 2 µl dos produtos das reações de clonagem foram usados para transformar cepas de *E. coli* DH5α pelo método de choque térmico. As colônias transformantes foram inoculadas em meio 2xTY com os antibióticos adequados a seleção de transformantes para cada plasmídeo e cultivadas sob agitação de 200 rpm a 37°C por 12 horas. As culturas foram, então, centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Por fim, o DNA plasmidial das células foi extraído utilizando o *kit* de extração *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific).

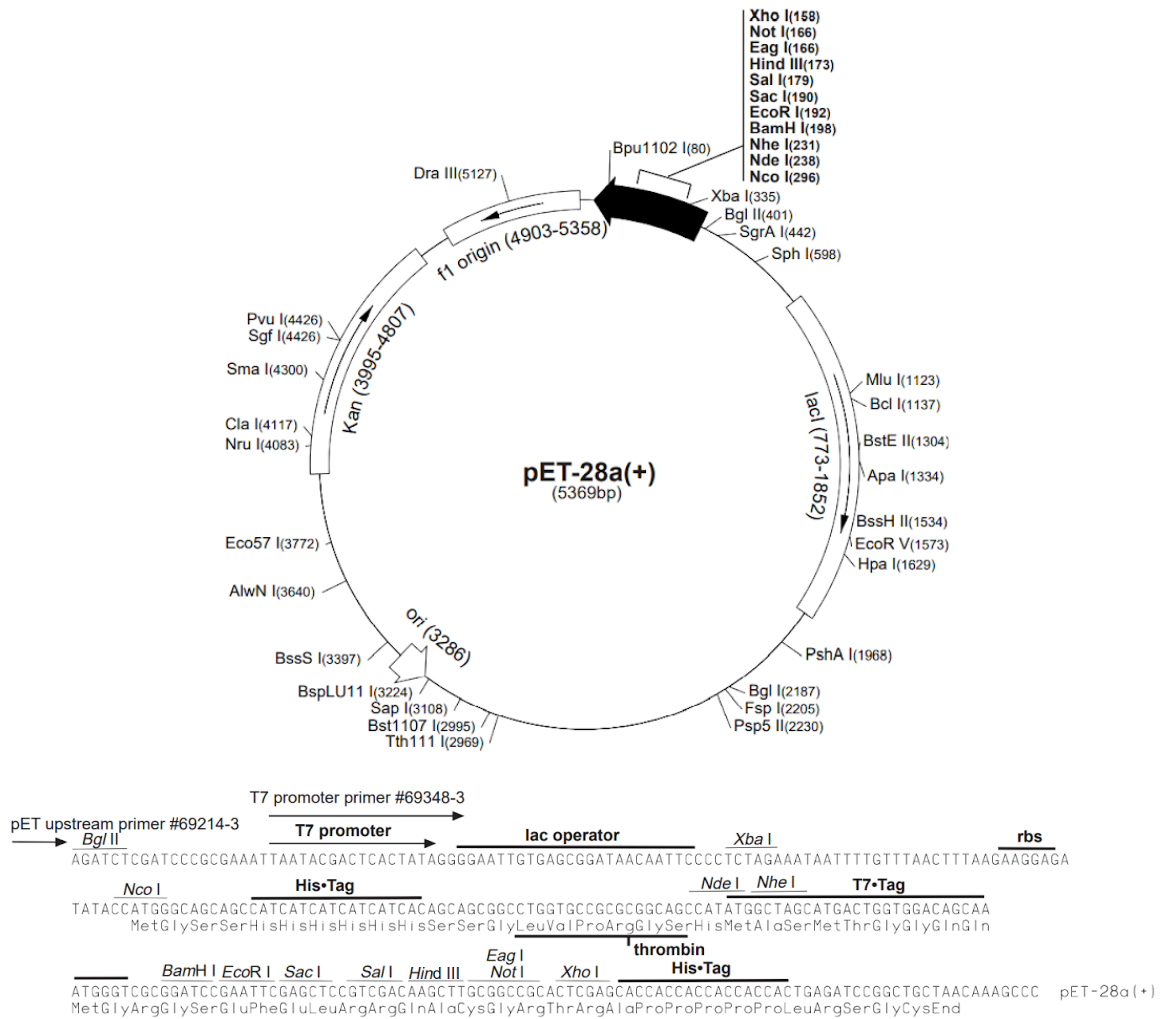
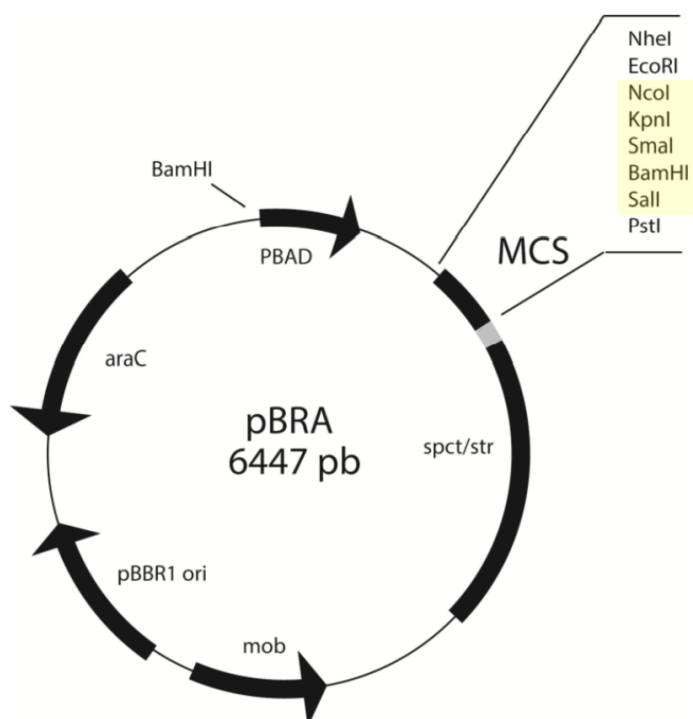
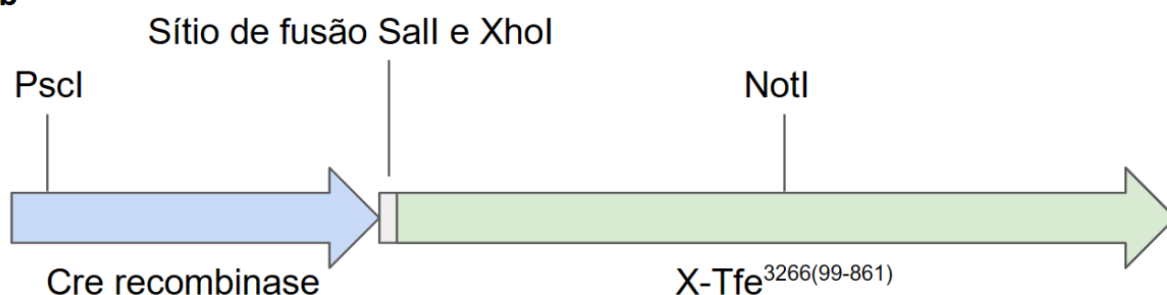


Figura 8: Representação esquemática do vetor de expressão pET28a (Novagen). As regiões destacadas do vetor são: *lacI*: repressor lac, pBR322 *ori*: origem de replicação, Kan: gene de resistência a canamicina, f1 *ori*: origem de replicação fágica, a região em preto: região de clonagem (terminador T7, sítio múltiplo de clonagem, sequência codificadora do His-tag, promotor T7 e o sítio de clivagem de trombina).

a



b



c



Figura 9: Clonagem em vetor pBRA. **(a)** Representação esquemática do vetor pBRA produzido pela Dra Miryam Marroquin (SOUZA et al., 2015). pBBR1 ori: origem de replicação do plasmídeo. araC: gene que codifica um ativador transcricional da promotor PBAD na presença de Arabinose. spct: gene de resistência a espectinomicina; str: gene resistência a estreptomicina. mob: gene que permite ao vetor ser transferido por conjugação. MCS: sítio de clonagem múltipla. Destacado em amarelo, os sítios de restrição foram excisados após a clivagem do plasmídeo para clonagem do inserto **(b)** mapa gênico com sítios de restrição da quimera X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁. É mostrado o gene que codifica a proteína Cre recombinase (azul) fusionada ao gene que codifica X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁ (verde). O sítio de formado pela ligação entre as extremidades coesivas geradas pelas enzimas de restrição XhoI e Sall aparece em cinza **(c)** Clonagem gênica usando ligação entre extremidades coesivas para construção do vetor pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹. São mostrados os sítios de clivagem das enzimas de restrição XhoI (amarelo) e Sall (verde), e produto de reação de ligação entre as extremidades geradas por essas enzimas, que não apresenta sítio de clivagem.

Os plasmídeos utilizados no desenvolvimento deste trabalho se encontram listados na Tabela 3.

Tabela 3: Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Finalidade Experimental	Marcador de resistência
pBRA	Clonagem/Controle	espectinomicina
pET28a	Clonagem/Controle	canamicina
pCM100	Repórter de recombinação Cre-Lox	canamicina
pBBR-GFP	Marcador de fluorescência	gentamicina
pBBR-RFP	Marcador de fluorescência	canamicina
pBRA-XAC3266	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	espectinomicina
pBRA-XAC3266-H12Q	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	espectinomicina
pBRA-XAC3267-3266	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	espectinomicina
pBRA-XAC3267	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	espectinomicina
pBRA-Cre	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	espectinomicina
pBRA-Cre-XAC3266 ⁹⁹⁻⁸⁶¹	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	espectinomicina
pET28a-XAC3266	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	canamicina
pET28a-XAC3266-H12Q	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	canamicina
pET28a-XAC3267-AHH	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	canamicina
pNPTS138a	Substrato para nuclease	canamicina

3.2. Transformação de bactérias

Transformação é um processo natural pelo qual DNA exógeno é introduzido em uma célula. Uma vez que este processo pode conferir à célula transformada a capacidade de expressar a informação genética adquirida, foram desenvolvidos métodos artificiais de se transformar bactérias de forma eficiente. Diversos métodos de transformação de bactérias se baseiam na despolarização da membrana celular

para possibilitar a entrada do DNA na célula (“Bacterial Transformation and Competent Cells–A Brief Introduction - BR”, [s.d.]

Tabela 4: Cepas utilizadas neste trabalho

Cepa	Referência
<i>E. coli</i> DH5 α	(HANAHAN; JESSEE; BLOOM, 1991)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	(STUDIER; MOFFATT, 1986)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)RIL	(CARSTENS et al., [s.d.]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	(DAVANLOO et al., 1984; STUDIER; MOFFATT, 1986)
<i>E. coli</i> MG1655	(BLATTNER et al., 1997)
<i>E. coli</i> BW25123+pSC101-PrecA:GFP	(RONEN et al., 2002)
<i>E. Coli</i> CSH26Cm::LTL	(LANG et al., 2010)
<i>P. aeruginosa</i> PA14	(HE et al., 2004)
<i>X. citri</i> selvagem (pv. citri 306)	(DA SILVA et al., 2002)
<i>X. citri</i> $\Delta 9\Delta 2611$	(OKA; FARAH, não publicado)
<i>X. citri</i> $\Delta 9$	(OKA et al., 2022)
<i>X. citri</i> $\Delta 8$	(BAYER-SANTOS et al., 2019)
<i>X. citri</i> $\Delta virB7$	(SOUZA et al., 2011)
<i>X. citri</i> $\Delta 3266/3267$	(BAYER-SANTOS et al., 2019)

3.2.1. Transformação de *E. coli* por choque térmico

A técnica de transformação por choque térmico com cloreto de cálcio é um método de transformação química que se baseia no efeito de um choque térmico em despolarizar fortemente a membrana de células competentes tratadas com CaCl₂ (YOSHIDA; SATO, 2009). Para a transformação por choque térmico o DNA plasmidial a ser usado para a transformação (10-50 ng) foram adicionados em 100 μ l

de células quimiocompetentes. Após 30 minutos em gelo, os tubos contendo as cepas foram colocados em banho a 42°C por 1 minuto e, em seguida, em gelo por 2 minutos. Foram adicionados aos tubos 900 µl de meio 2xTY e acondicionados à 37°C por 45 minutos. Por fim, as culturas foram concentradas a um volume de 100 µl por centrifugação e plaqueadas em placas de petri com meio 2xTY com 1,5% de ágar e contendo os antibióticos necessários para a seleção de colônias transformantes. As placas foram incubadas à 37°C por 14 horas para crescimento das colônias transformantes (FROGER; HALL, 2007).

3.2.2. Transformação por eletroporação

Na transformação por eletroporação, um campo elétrico externo a uma célula competente promove um aumento da permeabilidade da membrana. Esse aumento de permeabilidade se dá através da formação transiente de poros na membrana facilitando a passagem de moléculas eletricamente carregadas (TYLEWICZ, 2020).

Para a transformação de *E. coli* por eletroporação adiciona-se o DNA plasmidial (<100 ng) a ser usado para a transformação a 50-100 µl de células eletrocompetentes, agitando gentilmente. As células são deixadas em gelo por 10 minutos e, em seguida, transferidas com ajuda de uma pipeta para uma cubeta de eletroporação. As cubetas são submetidas a eletroporação com uma voltagem de 2,5 kV através de um eletroporador *Micro Pulser* (Bio-Rad). Após o processo de eletroporação, é adicionado 900 µl de meio 2xTY e a mistura é transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. A mistura é incubada a 37°C por 45 min e plaqueada em meio 2xTY com 1,5% de ágar e os antibióticos adequados a seleção

dos transformantes. As placas são incubadas por 14 horas a 37°C para o crescimento das colônias transformantes.

Para a transformação de *Xanthomonas citri* por eletroporação, adiciona-se o DNA plasmidial (50-500 ng) a ser usado para a transformação a 50-100 µl de células eletrocompetentes, agitando gentilmente. As células são deixadas em gelo por 10 minutos e, em seguida, transferidas com ajuda de uma pipeta para uma cubeta de eletroporação. As cubetas são submetidas a eletroporação com uma voltagem de 2,0 kV, 25 µF de capacitância e 200Ω de resistência, por meio de um eletroporador *Gene pulser* (Bio-Rad). Após o processo de eletroporação, é adicionado 500 µl de meio 2xTY e a mistura é transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. A mistura é incubada sob agitação de 200 rpm a 28°C por 3-4 horas, após esse centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e parte do sobrenadante é descartado deixando apenas 100 µl de meio no qual as células são ressuspensas. Essa suspensão é transferida para meio 2xTY com 1,5% de ágar e os antibióticos adequados a seleção dos transformantes. As placas são incubadas por 14 horas a 37°C para o crescimento das colônias transformantes (OSHIRO et al., 2006).

3.3. Expressão heteróloga de proteínas em 2xTY

Cepas de *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21(DE3)RIL foram transformadas com os plasmídeos pET28a que codificam as proteínas de interesse. Para preparar um pré-inóculo, foram selecionadas 4 colônias transformantes e inoculadas em 40 ml de meio 2xTY contendo canamicina a 40 µg/ml e crescidas overnight a 200 rpm a 37°C. A seguir, o pré-inóculo foi diluído a 1L de meio 2xTY com canamicina à 40 µg/ml e deixado à 37°C a 200 rpm até atingir a fase exponencial de crescimento bacteriano

(DO 0,5-0,9 a 600 nm). Depois a cultura foi ambientada para 18°C e, após 40 minutos, foi adicionado 300 µL de O isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1M. A cultura foi induzida por 16 horas a 200 rpm e 18°C. Finalizado o tempo de indução, a cultura foi dividida em tubos de 0,5L e centrifugado a 9000 rpm por 17 min a 4°C. As células foram, então, transferidas para tubos *falcon* de 50 ml com ajuda de uma espátula e centrifugado a 4000 rpm por 4 min a 4°C. Por fim, os tubos foram congelados a -80°C. Foram retiradas amostras da cultura antes e após a indução e congeladas a -20°C para verificar, posteriormente, por eletroforese em gel de poliacrilamida, se a proteína estava solúvel.

3.3.1. Expressão heteróloga de proteínas em meio ZYP-5052

Visando evitar a interferência da toxicidade do efetor na expressão da proteína, foi usada uma linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Essa cepa de expressão carrega o plasmídeo auxiliar pLysS, que expressa baixos níveis de lisozima T7, reduzindo a expressão da T7 RNA polimerase e, desta forma, prevenindo a expressão basal da proteína codificada pelo vetor de expressão. As cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram transformadas com plasmídeos pET28a que codificam as proteínas de interesse. Para preparar um pré-inóculo, foram selecionadas 4 colônias transformantes e inoculadas em 5 ml de meio 2xTY contendo 50 µg/ml de canamicina, 100 µg/ml de espectinomicina e 0,4% de glicose. O pré-inóculo foi cultivado a 200 rpm a 37°C, até que a cultura celular atingisse a DO de 0,6. Então, 2,5 ml das culturas foram inoculadas em um Erlenmeyer de 2 litros contendo 500 ml de meio autoindutor ZYP-5052 (1 % de triptona, 0.5 % de extrato de levedura, 25 mM Na₂HPO₄ , 25 mM KH₂PO₄ , 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄ , 2

mM $MgSO_4$, 0.5 % de glicerol, 0.05 % glicose, 0.2 % de α -lactose) (STUDIER, 2005). O meio autoindutor a glicose inibe a expressão da proteína durante o crescimento celular. Quando a glicose é consumida a expressão é induzida pela presença de lactose. As culturas foram mantidas a 37°C, com agitação de 200 rpm, por 15 horas. Após a indução, a cultura de células foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet congelado a -80°C.

3.4. Lise celular

Para a lise, as células contendo a proteína de interesse foram ressuspensas em um tampão de lise (20 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl e 2% de glicerol. Foi adicionado 60 μ l de coquetel de inibidor de protease P8465 (Sigma-Aldrich). As células foram então lisadas com prensa francesa ou sonicador.

3.4.1. Lise por prensa French

As suspensões foram então lisadas através de extrusão por pressão, utilizando uma prensa *French*, na qual, uma prensa hidráulica força a passagem da suspensão de células por uma válvula sob alta pressão. As membranas celulares são rompidas pela tensão de cisalhamento gerada pela diferença de pressão ao qual a amostra é submetida. Para a lise foi usada uma *French press cell press* (LSM-Aminco), a lise foi feita repetindo a passagem das células 5 vezes, sob a pressão de 2500 psi, com a célula do equipamento previamente resfriada.

3.4.2. Lise por sonicação

Neste procedimento, as células em suspensão foram lisadas por sonicação, técnica na qual a propagação de ondas de ultrassom no meio líquido provoca cavitação, que gera uma tensão de cisalhamento que rompe a célula.

A suspensão foi mantida em gelo e a lise foi feita usando um sonicador modelo *Sonics Vibra-Cell* (Biovera), com uma ponteira de 13 mm, operando a uma amplitude de pulso 40%, com um período de sonicação de 15 segundo e intervalo de 45 segundos. O procedimento de lise foi feito em 2 períodos de 4 minutos com 5 minutos de descanso entre eles.

3.5. Cromatografia de afinidade

As suspensões de células lisadas foram centrifugadas a 4000 xg por 15 minutos a 4°C. Devido a presença da cauda de poli-histidina no N-terminal da proteína, a primeira etapa de purificação foi feita por cromatografia de afinidade usando uma coluna Hitrap Chelating HP de 5mL (GE Healthcare, previamente carregada com Ni²⁺ usando o equipamento ÄKTA Start (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com o tampão A, que possui baixa concentração de imidazol (50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM de imidazol e 2 % (v/v) de glicerol). A eluição foi realizada com gradiente de concentração de imidazol de 20 mM até 500 mM e o processo foi acompanhado através da medição da absorbância a 220 nm e 280 nm.

Para as proteínas X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}, foi utilizado um tampão A com 5 mM de imidazol, e a eluição foi realizada com gradiente variando de 5 a 300 mM de imidazol.

Alíquotas das frações que apresentavam absorbância, bem como do pellet, do sobrenadante e do *flow through* foram coletadas para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida 17,5% SDS-PAGE juntamente com alíquotas das frações induzidas e não-induzidas previamente coletadas. Os tubos que apresentaram bandas na faixa de peso molecular correspondente à massa molecular teórica da proteína foram diluídos com tampão até um volume de 10ml com uma concentração final de glicerol de 20% e congelados a -80°C.

3.5.1. Clivagem com trombina

Para as proteínas cuja cauda de poli-histidina precisou ser retirada, foi feita uma clivagem com trombina. Primeiramente foi retirado o imidazol das amostras uma vez que a presença do composto interfere no processo de clivagem. As amostras advindas da cromatografia de afinidade foram descongeladas em gelo, as frações contendo a proteína foram misturadas juntas em um tubo de filtração por centrifugação Amicon Ultra Millipore de 30 kDa (Merck) e centrifugadas a 3000 rpm a 4°C por 30 min. Após o descarte do filtrado a amostra de proteína foi ressuspensa em tampão de trombina (20 mM Tris pH 8,0, 20 mM NaCl, glicerol 1%) e o processo foi repetido duas vezes. A proteína foi, então, transferida para um tubo *falcon* de 15 ml contendo 300 µL de trombina ativa do *kit Thrombin Clean Cleave* (Sigma Aldrich). O volume foi completado com tampão de trombina até o volume de 15 mL e a reação foi conduzida à temperatura ambiente por 8 horas com o tubo girando vagarosamente. Após o processo de clivagem, alíquotas de 10 µL foram retiradas para a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida com géis de Tris-tricina 10%, para avaliar a eficiência da clivagem e o estado da proteína. O Tubo de reação

foi, então, centrifugado, o sobrenadante com o produto da reação foi separado da resina contendo a trombina e armazenado em gelo.

Para retirar a cauda de histidina clivadas e possíveis proteínas que não tenham sido clivadas, foi feita uma nova etapa de purificação por cromatografia de afinidade usando a mesma coluna do item 2.3.3. O procedimento foi feito usando uma bomba peristáltica, uma vez que não era necessário um gradiente de imidazol. A etapa de purificação se procedeu na seguinte sequência: primeiro foi a coluna foi lavada com 50 ml de água, depois 50mL de tampão A, depois a mostra de proteína, e, em seguida, 50 ml do tampão A. por fim, 25 ml do tampão B (50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM de imidazol e 2 % (v/v) de glicerol). Foi retirada uma amostra de cada passo dessa etapa de purificação para realização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida de Tris-Tricina. Cada amostra também teve a quantidade de proteína determinada por medição da absorvidade molar, medindo a absorbância a 280nm com um aparelho Nanodrop TM One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific).

A fração eluída durante as etapas iniciais de lavagem da coluna, contendo a proteína (correspondente ao volume de solução da proteína adicionado e do tampão B usado para lavagem) foi concentrada por centrifugação com tubo Amicon a 3000 rpm 4°C por 30 min. O processo foi repetido até que o todo volume contendo a proteína fosse reduzido a 5 ml.

3.6. Cromatografia de exclusão molecular

A etapa final de purificação foi feita por cromatografia de exclusão molecular. Foi usada uma coluna Superdex S200 (GE Healthcare) acoplada ao equipamento ÄKTA Pure (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM NaCl e 2% de glicerol. A presença de proteína nas frações eluídas foi monitorada por absorvância a 220 nm e 280 nm. As frações que continham proteína foram armazenadas em gelo e amostras de cada uma delas foram analisadas por SDS-PAGE para verificar a presença da proteína de interesse e sua pureza. As frações centrais do pico do cromatograma (onde as proteínas aparecem mais puras no gel) foram misturadas e a concentração de proteína foi estimada medindo a absorvância molar no Nanodrop. Por fim, as amostras foram concentradas utilizando um tubo Amicon de 15 ml em centrifugação a 3000 rpm à 4°C por 30 min, e congeladas a -80°C.

3.6.1. Determinação do estado oligomérico de proteínas

A determinação do estado oligomérico das proteínas foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (SEC) acoplada a um detector de espalhamento de luz multiângulo, ou *Multiangle Light Scattering* (MALS). O espalhamento de luz foi medido pelo detector de espalhamento de luz miniDAWN TREOS II (Wyatt), a concentração da proteína foi determinada pelo refratômetro Optilab T-rEX (Wyatt), e os dados coletados de cada experimentos foram processados pelo programa *Astra*.

Para o procedimento foi usada uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, 5% de glicerol, acoplada a um ÄKTA purifier 900 FPLC system (GE Healthcare). As amostras de proteínas foram eluídas no mesmo tampão a uma vazão de 0,5 ml/minuto a temperatura ambiente. A presença de proteína nas frações eluídas foi monitorada por absorvância a 220 nm e 280 nm. A massa molecular das proteínas foi determinada no Astra. As frações que continham proteína foram armazenadas em gelo e amostras de cada uma delas foram analisadas por SDS-PAGE para verificar a presença da proteína. As amostras de proteínas foram congeladas a -80°C após adição de glicerol até a concentração de 20%.

3.7. Curvas de crescimento microbiano

Os plasmídeos pBRA que codificam X-Tfe^{XAC3266} (efetor), X-Tfi^{XAC3267}/X-Tfe^{XAC3266} (par efetor-inibidor) e X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} (efetor mutante) foram usados para transformar cepas de *E. coli* DH5 α . Também foi transformada uma cepa com plasmídeo vazio, como controle. Colônias das cepas transformantes foram inoculadas em meio 2xTY contendo 100 μ g/ml de espectinomicina e 0,4% de glicose. As culturas foram mantidas sob agitação de 200 rpm a 37°C *overnight*. Todas as culturas foram re-inoculadas com uma diluição de 100 vezes em meio de igual composição, exceto pela ausência de glicose. Após 4 horas a 200 rpm e 37°C, as culturas foram normalizadas para uma densidade óptica (DO 600 nm) 0,6. As culturas foram imediatamente inoculadas em uma placa de cultura de 24 poços previamente aquecida a 30°C, contendo 1 ml de meio 2xTY com 100 μ g/ml de espectinomicina em cada poço. Cada cultura foi inoculada em 6 poços com um

volume de cultura suficiente para uma DO de 0,05. A placa foi colocada sob agitação de 200rpm a 30°C e a DO a 600 nm das culturas foi medida em um leitor de placas *Spectramax Paradigm (Molecular Devices)* a cada 45 minutos. Após 135 minutos, foi adicionado arabinose a metade dos poços de cada cultura para uma concentração final de 0,1%.

Para curvas de crescimento com vetor pET28a, os mesmos foram usados para transformar por eletroporação cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS competentes. Três colônias de cada transformante foram inoculadas em uma placa de cultura de 24 poços com 1 ml de meio autoindutor ZYP-5052 em cada poço. As culturas foram colocadas em leitor de placas e mantidas à temperatura ambiente e 150 rpm de agitação. A absorbância no comprimento de onda 600 nm foi medida a cada 5 minutos por 12 horas.

Como controle, foram realizadas, em paralelo, as mesmas culturas utilizando uma versão modificada do meio ZYP-5052 na qual a lactose era substituída por 0,2% de glicose.

3.8. Ensaios de competição bacteriana

Para ensaios de competição foram usados os protocolos já estabelecidos para avaliar a capacidade de *X. citri* em matar *E. coli*, dependente de T4SS (SOUZA et al., 2015). Foram usadas cepas tipo selvagem (*wild-type*, WT) e cepas nocaute (*knock out*) produzidas por Gabriel Oka (BAYER-SANTOS et al., 2019; SOUZA et al., 2015): Δ 3266/3267 (deficiente deste par efetor/inibidor), Δ 8 (cepa deficiente de todos os pares efetor/inibidor exceto Tfi^{XAC3267}/Tfe^{XAC3266}), Δ 9 (cepa sem nenhum par efetor/inibidor) e Δ virB7 (nocaute do gene *virB7* cujo X-T4SS não é funcional). As

cepas foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo pBRA-vazio. As linhagens foram cultivadas em 1 ml de meio 2xTY com 100 µg/ml de ampicilina e 0,4% de glicose, a 200 rpm e 30°C por 24 horas. As culturas foram descartadas e a cultura residual foi usada para inocular 1 ml de meio idêntico, sob as mesmas condições, por mais 12 horas. As culturas foram, então, centrifugadas, o sobrenadante retirado, e as células ressuspensas em meio 2xTY. O processo foi repetido três vezes. Todas as culturas foram incubadas a 30°C por 2 horas e, em seguida, diluídas com meio 2xTY para normalizar a DO_{600nm} para 2,0.

Paralelamente, a cepa de *E. coli* MG1655 foi transformada por eletroporação com pBRA-vazio. Colônias transformantes foram inoculadas em 5ml de meio 2xTY com 40 µg/ml de canamicina e crescidas por 12 horas sob agitação de 200 rpm a 37°C. Depois, as células foram reinoculadas em 50 ml de meio 2xTY para uma DO inicial 0,05 e deixada crescer sob as mesmas condições por 3 horas. A seguir, a cultura foi lavada 3 vezes com água mili-Q, ressuspensa em meio 2xTY sem antibiótico e normalizada para DO_{600nm} de 0,1.

Culturas de células de cada cepa de *X. citri* foram misturadas com as de *E. coli* MG1655 em uma DO_{600nm} de 1 e 0,05 respectivamente. Foram pipetadas 5 µL de cada mistura em uma placa de petri com meio 2xTY sólido com 100 µg/ml de espectinomicina, e arabinose 0,1%. As células foram mantidas em co-cultura a 30°C por 18 horas. Após esse período, as células foram ressuspensas em meio 2xTY. Foram feitas diluições seriadas das culturas e, as mesmas foram plaqueadas em duas placas com meio sólido seletivo. Para seleção de *X. citri* foram usadas placas com meio contendo 100 µg/ml de ampicilina e 100 µg/ml, incubadas à 30°C. Já para seleção de *E. coli*, foram usadas placas sem antibiótico, com 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal) e IPTG, incubadas à 37°C.

As colônias foram contadas, e foram determinados os valores de unidades formadoras de colônia por ml (CFU/ml). Com esses valores, foram calculadas a razão de CFU/ml entre *X. citri* e *E. coli* antes e após o período de competição para cada cepa de *X. citri* testada. O ensaio também foi realizado, sob as mesmas condições usando *P. aeruginosa* PA14 como receptora no lugar de *E. coli* MG1655.

Os ensaios de competição também foram realizados utilizando uma cepa de *X. citri* mutante como célula receptora, para isso o ensaio foi adaptado para ser executado com uma cepa *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$, produzida por Gabriel Oka (não publicado) que, além de não possuir nenhum par efetor inibidor do X-T4SS de *X. citri*, também tem deletado o gene que codifica o inibidor geral do sistema, XAC2611. Dessa forma, essa cepa é sensível à ação do T4SS de *X. citri* selvagem.

Para essa competição, a cepa *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ foi transformada com os plasmídeos pBRA-vazio, que possui um gene que confere resistência a espectinomicina e pBBR-RFP (OKA et al., 2022), que possui um gene que confere resistência a canamicina e um gene que codifica a proteína fluorescente vermelha (RFP; por eletroporação. As cepas de *X. citri* doadoras foram transformadas com o plasmídeo pBRA-vazio e o plasmídeo pBBR-GFP (SOUZA et al., 2015), que possui um gene que confere resistência a gentamicina, e um gene que codifica a proteína fluorescente verde (GFP) . Essa cepa foi cultivada com a mesma metodologia usada para as cepas de *X. citri* doadoras, descrita acima. Após o cultivo e a lavagem das células, ambas as cepas, doadoras e receptora, foram cocultivadas em uma DO final de 1 em uma placa de petri com 20% de 2xTY, 1% de agarose e 100 $\mu\text{g/ml}$ de espectinomicina a temperatura de 22°C por 40 horas.

Após esse período, a placa onde foram realizadas as competições foi submetida a leitura dos níveis de fluorescência por meio de um fotodocumentador

ChemieDoc (Biorad) no Laboratório de Estabilidade Genômica do IQ-USP. Foram registradas a fluorescência a 520 após excitação a 488 para a visualização das células doadoras, que expressam proteína fluorescente verde (GFP), e a 590 após excitação a 550 para visualização das células doadoras, que expressam proteína fluorescente vermelha (RFP).

Em seguida, as células em competição foram recuperadas usando placas contendo ampicilina 100 µg/ml e gentamicina 20 µg/ml para selecionar a células doadoras, e 100 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de canamicina para selecionar as células receptoras. Ambas as placas foram incubadas a 30°C para crescimento e posterior contagem das colônias.

3.9. Ensaio de Translocação do efector

3.9.1. Conceito de CRAFT

O ensaio de translocação com recombinase Cre, ou CRAFT (*Cre recombinase assay for translocation*), utiliza o sistema de recombinação Cre-Lox para detectar a translocação de uma proteína de uma célula doadora para uma célula alvo/recipientes. Com esse objetivo, é construída uma quimera formada pela recombinase Cre do bacteriófago P1 fusionada a um efector do sistema de secreção em estudo para promover uma recombinação no DNA de uma célula alvo/recipientes (DEN DULK-RAS; VERGUNST; HOOYKAAS, 2014; VERGUNST et al., 2000). Para isso, a célula recipientes deve possuir um gene repórter inativo pela inserção de uma sequência de DNA flanqueada por sítios *loxP* que serão reconhecidos pela recombinase. Desta forma, se ocorrer translocação da quimera da célula doadora

para a recipiente, a recombinase removerá os sítios *loxP* junto com o trecho de DNA entre eles, ativando o gene repórter (LANG et al., 2010; TROKTER; WAKSMAN, 2018), como mostrado na Figura 10a.

Para o ensaio CRAfT, foram usados dois plasmídeos. O primeiro, pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹, cuja construção é descrita no item 3.1.2, possui o gene codificando a proteína quimera que consiste da proteína Cre fusionada com a proteína X-Tfe^{XAC3266} sem o domínio AHH (resíduos 99-861). O segundo plasmídeo, pCM100, foi desenvolvido pela Dra. Cristina Alvarez-Martinez e contém um gene para resistência à canamicina seguido de um terminador de transcrição (não publicado). Esse conjunto é flanqueado por sítios LoxP orientados para o mesmo sentido. A jusante desse conjunto existe um gene para resistência a gentamicina (Figura 10c). Por conta dessa organização gênica, o plasmídeo confere resistência à canamicina e, por causa do terminador, não confere resistência à gentamicina. Porém, na presença da proteína Cre (ou uma quimera contendo um domínio Cre) deve resultar na remoção da região flanqueada pelas sequências de *loxP* fazendo com que o plasmídeo que conferia resistência a canamicina passe a conferir resistência à gentamicina.

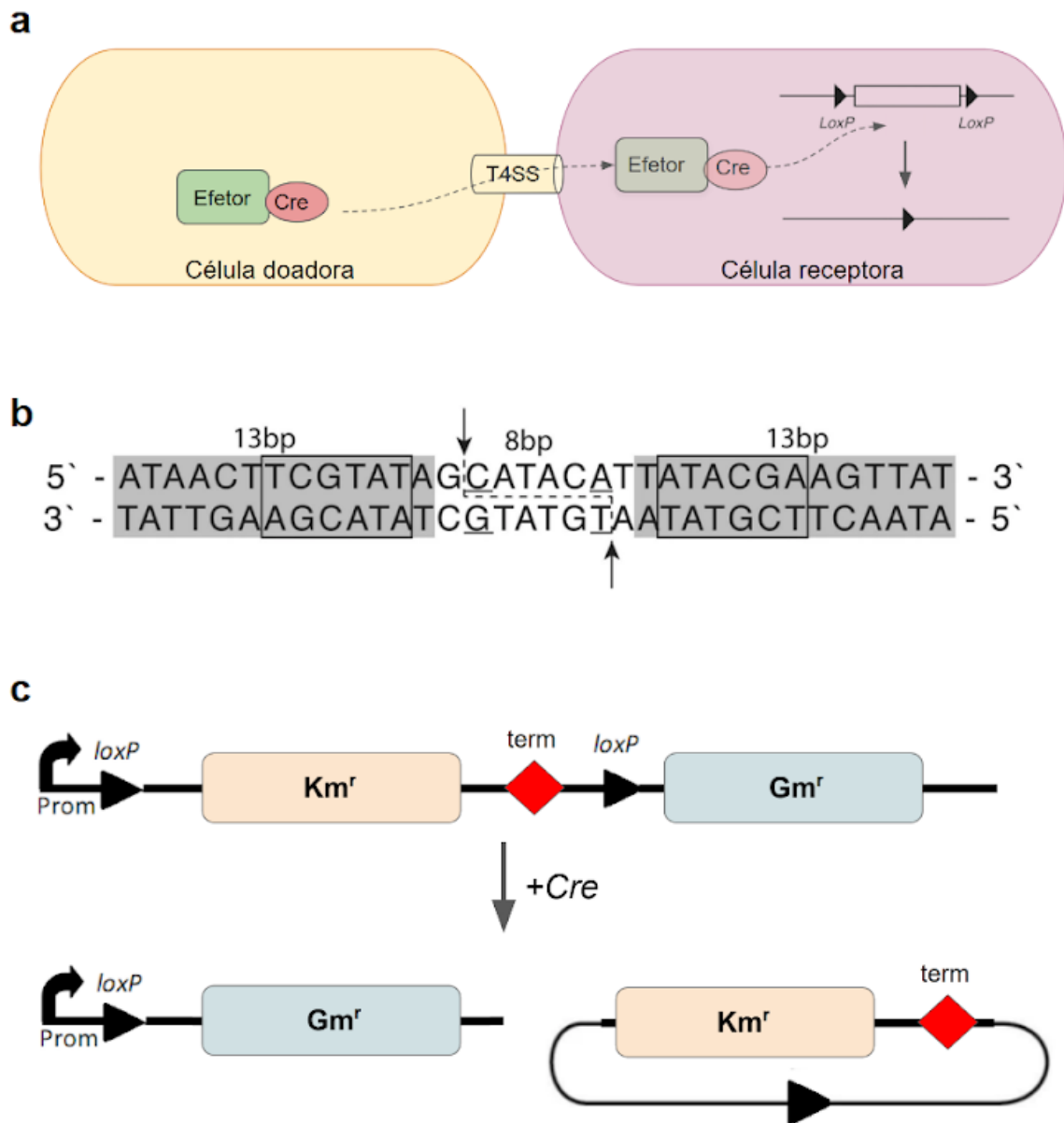


Figura 10: Ensaio de translocação por recombinase Cre (CRAFT). **(a)** Representação esquemática do princípio de funcionamento do experimento CRAFT (HARMS et al., 2017). **(b)** O sítio *loxP* tem 34 pares de bases (pb) de comprimento. Nele duas sequências palindrômicas de 13 pb, contendo o sítio de ligação Cre (em caixa), flanqueiam uma sequência assimétrica de 8 pb. As setas indicam os locais de clivagem durante a recombinação (KRATOCHWIL; RIJLI, 2020). **(c)** Representação esquemática da região do plasmídeo pCM100 e o evento de recombinação provocado pela ação da recombinase Cre nos sítios *loxP* (Figura cortesia da Dra. Cristina Alvarez-Martinez, UNICAMP). Na sequência temos: região promotora (seta), sítio *LoxP* (triângulo), gene de resistência a canamicina (Km^r), terminador (losango vermelho), sítio *LoxP*, gene de resistência a gentamicina (Gm^r).

3.9.2. Ensaio de recombinação Cre-Lox por expressão heteróloga

Antes de fazer o ensaio CRAFT, foi preciso demonstrar que a construção quimera Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹ é capaz de promover recombinação nos sítios *loxP*. Para isso, foram feitos experimentos de expressão induzida da proteína quimera em *E. Coli* CSH26Cm::LTL, uma cepa, gentilmente cedida pela Dra. Ellen Zechner (LANG et al., 2010). A cepa contém, integrado ao genoma, um gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol interrompido por um gene de resistência à tetraciclina flanqueado por sequências *loxP*. A proteína com domínio Cre remove o gene de resistência a tetraciclina, restabelecendo a integridade do gene de resistência a cloranfenicol. Desta forma, a bactéria resistente a tetraciclina e sensível a cloranfenicol se torna, sob ação de Cre, resistente a cloranfenicol e sensível a tetraciclina como mostrado na Figura 11.

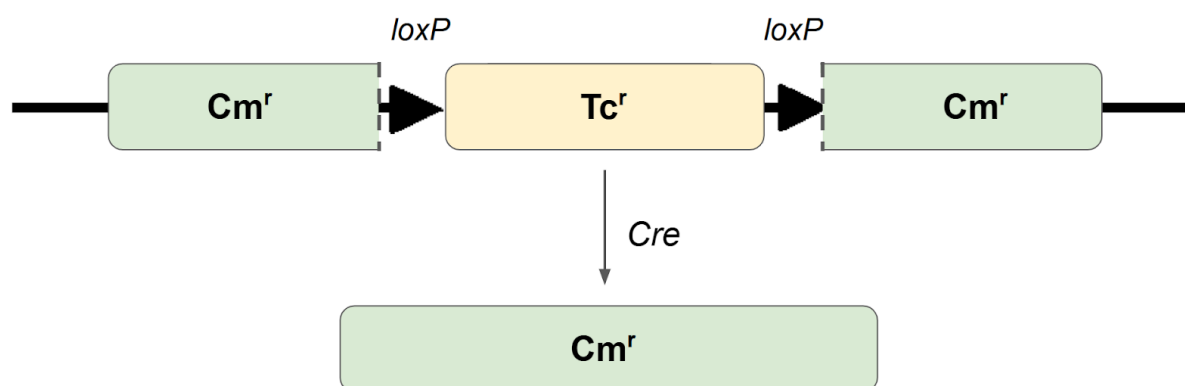


Figura 11: Representação esquemática do cassete de recombinação presente no genoma da bactéria *E. Coli* CSH26Cm::LTL (LANG et al., 2010). O cassete com gene de resistência a tetraciclina (Tc^R) em verde, flanqueado pelas sequências de recombinação *LoxP* e interrompendo o gene de resistência a cloranfenicol (Cm^R) em rosa. A quimera promove recombinação removendo o gene de resistência a tetraciclina e as sequências *LoxP*, restaurando o gene de resistência a cloranfenicol.

Foram feitos experimentos de expressão induzida da proteína Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹ em *E. Coli* CSH26Cm::LTL. Para tal, células competentes de

DH5- α foram transformadas por choque térmico com cloreto de cálcio com os plasmídeos pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹, pBRA-Cre e pBRA (vazio). Após o choque térmico, as células foram recuperadas com adição de 1ml de meio 2XTY com 0,1% de arabinose e deixadas a 37°C por 1 hora. Após esse período, as culturas foram concentradas a um volume de 200 μ L por centrifugação, foram plaqueadas duas placas de petri com meio 2XTY sólido. Uma placa contendo espectinomicina 100 μ g/ml, para selecionar as transformantes que não sofreram recombinação, e outra contendo cloranfenicol 25 mg/ml, para selecionar transformantes que sofreram recombinação. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C. Por fim, o número de colônias foi contado e a razão entre colônias recombinantes e não recombinantes foi calculada para cada cultura. O experimento foi feito em triplicata.

3.9.3. Ensaio de translocação de recombinase Cre (CRAFT)

Para tal, células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico com cloreto de cálcio com os plasmídeos pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹, pBRA-Cre e pBRA (vazio). Após o choque térmico, as células foram recuperadas com adição de 1ml de meio 2xTY com 0,1% de arabinose e deixadas a 37°C por 1 hora. Após esse período, as culturas foram concentradas a um volume de 200 μ L por centrifugação, foram plaqueadas duas placas de petri com meio 2XTY sólido. Uma placa contendo espectinomicina 100 μ g/ml, para selecionar as transformantes e outra contendo cloranfenicol 25 mg/ml, para selecionar as recombinantes. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C. Por fim, o número de colônias foi contado e a razão entre colônias recombinantes e transformantes foi calculada para cada cultura. O experimento foi feito em triplicata.

Células eletrocompetentes de *Xanthomonas citri* $\Delta 9$ (cepa nocaute sem nenhum dos pares efetor/inibidor referente ao T4SS) foram transformadas com pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹ e pBRA-Cre. Como controle, células da mesma linhagem também foram transformadas com o vetor pBRA vazio. As células foram plaqueadas em placas com meio 2xTY com 1,5% de ágar contendo espectinomicina à 100 $\mu\text{g/ml}$ para seleção das transformantes e foram incubadas por 48 horas à 30°C. Uma colônia de cada transformante foi inoculada em em uma placa para cultura de células de 24 poços (*Costar 3524*) com 1 ml de meio em cada poço, com a mesma concentração de antibiótico e com 0,1% de arabinose . A placa foi mantida sob agitação à 200 rpm, à 30°C. Após 24 horas o conteúdo dos poços foi removido por pipetagem e descartado, deixando um resíduo que serviu de inóculo, e adicionou-se 1 ml de meio de cultura em cada poço, com a mesma configuração da inoculação inicial. A placa foi mantida sob as mesmas condições de crescimento por mais 12 horas. As culturas foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, centrifugadas à 5000 rpm por 5 minutos à 4°C; o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 ml de meio 2xTY. Para retirar o antibiótico o processo foi repetido 3 vezes, sendo que na última as células foram ressuspendidas em 1 ml de meio 2xTY com 0,1% de arabinose, sem antibiótico. As culturas foram mantidas incubadas a 30°C por 2 horas. Após esse período, as culturas de *Xanthomonas citri* foram normalizadas para $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 2,0.

Paralelamente, o mesmo processo foi realizado com uma cepa de *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ transformada por choque térmico com o plasmídeo pCM100. As colônias transformantes foram selecionadas em placas com 50 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Culturas dessas transformantes foram preparadas para o ensaio CRAFT seguindo as mesmas etapas (descritas acima) usadas para preparar as

cepas de *X. citri* doadoras com exceção do antibiótico usado nas culturas que, ao invés de espectinomicina, foi usado 50 µg/ml de canamicina.

Após a preparação das células de *X. citri* doadoras e receptoras, cada cepa doadora foi misturada em partes iguais com a cepa receptora para uma DO_{600nm} final de 1. Cada mistura de cepas doadoras e receptoras teve 5 µl pipetados em uma placa de petri com meio 2xTY, ágar 1,5% e ampicilina 100 µg/ml. Foram feitas 3 placas para a co-cultura do ensaio CRAFT. Duas placas foram incubadas a 30°C 20 horas e 1 foi incubada a 30°C por 3 horas. Após os períodos de co-cultura, as células foram ressuspensas em 1 ml de uma solução de NaCl 0,9%. As suspensões de células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e 800 µl do sobrenadante foi descartado com ajuda de uma pipeta. As células foram ressuspensas no volume restante e 100 µl foram plaqueadas em placas de petri com meio 2xTY com 1,5% de ágar, 100 µg/ml de ampicilina e 20 µg/ml de gentamicina para seleção de bactérias recombinantes. Os 100 µl restantes foram submetidos a uma diluição seriada (10x cada passo) e as diluições foram plaqueadas em meio 2xTY com 1,5% de ágar, 100 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de canamicina para seleção das não células não recombinantes.

3.10. Ensaio de ativação do sistema SOS de reparo de DNA

A resposta SOS (*save our soul*) é um sistema de reparo de DNA presente em procariotos, que é ativado quando ocorre um dano ao material genético da bactéria. O sistema é formado por dezenas de operons que são reprimidos por um repressor global chamado LexA, que se liga nas regiões promotoras desses operons. Quando ocorre um dano no DNA, RecA, uma das proteínas do sistema SOS, se liga à fita

simples de DNA, tornando-se ativa. Uma vez ativa, RecA medeia a autoclivagem de LexA, liberando as regiões promotoras dos genes SOS, cuja expressão desencadeia vias que aumentam as chances de sobrevivência das células, como reparo de DNA, mutagênese, persistência, etc. (Figura 12; (RONEN et al., 2002; SELWOOD et al., 2018)).

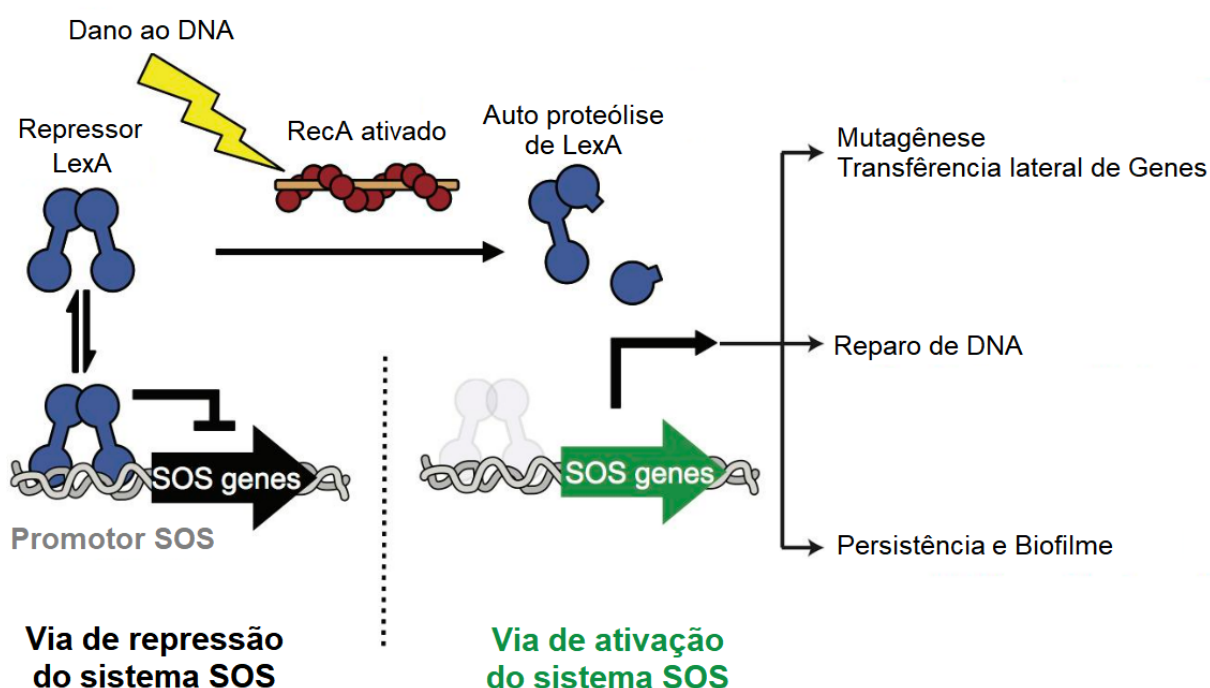


Figura 12: Representação esquemática do sistema SOS de reparo de DNA retirado de (SELWOOD et al., 2018).

O sistema SOS é usado como repórter para a detecção de danos no DNA e tem sido usado com sucesso para determinar atividade nucleáse de efetores do T6SS (JANA; SALOMON; BOSIS, 2020).

Foi utilizada uma cepa de *E. coli* BW25123 portando o plasmídeo pSC101-PrecA:GFP cedida pela Dr. Estela Ynés Valência (RONEN et al., 2002). O plasmídeo codifica o gene da proteína verde fluorescente (GFP) sob o controle do

promotor do gene *recA*, fazendo que, quando o sistema SOS de reparo de DNA é ativado a célula expressa GFP, se tornando fluorescente (Figura 13).

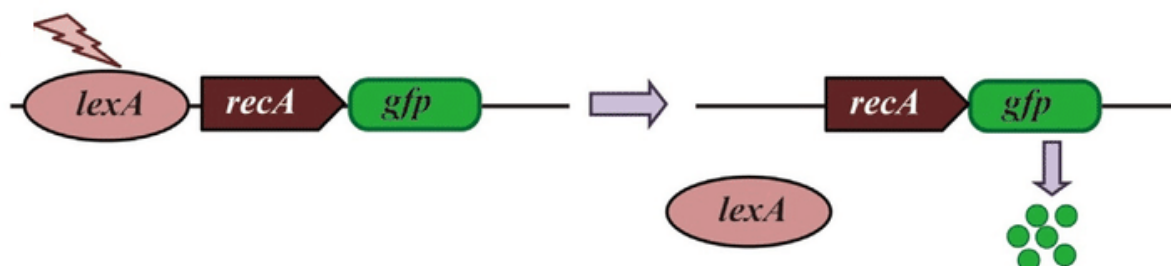


Figura 13: Representação esquemática do funcionamento do plasmídeo pSC101-PrecA:GFP (MARUTHAMUTHU et al., 2017).

Células eletrocompetentes de *E. coli* BW25123 foram transformados por eletroporação com os plasmídeos pBRA-XAC3266, pBRA-XAC3267-3266, pBRA-XAC3266-H12Q e pBRA-vazio. As cepas transformantes foram inoculadas em 2 ml meio 2xTY com 100 µg/ml de espectinomicina, 40 µg/ml de canamicina e 0,4% de glicose (para inibir a expressão de X-Tfe^{XAC3266} e/ou X-Tfi^{XAC3267}). As culturas foram mantidas a 37°C a 200 rpm por 16 horas. As suspensões de células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet foi ressuscitado em 2 ml de meio 2xTY. O processo de lavagem foi repetido três vezes. Cada cultura foi usada para inocular 1 ml de meio 2xTY contendo 100 µg/ml de espectinomicina, 40 µg/ml de canamicina e 0,1% de arabinose, de forma que a cultura resultante apresentasse uma DO de 0,5 a 600 nm. Também foi inoculada uma cultura das células contendo o vetor vazio, em meio idêntico a este, suplementado com 0,5 µg/ml de ciprofloxacino, como controle positivo (ciprofloxacina inibe topoisomerase IV e DNA gyrase, resultando em fragmentação do DNA e a indução da resposta SOS). Paralelamente, foi feita outra inoculação em meio idêntico exceto que, ao invés de arabinose, foi utilizado 0,4% de glicose. As culturas foram incubadas a 30° sob agitação de 200 rpm por 2 horas. Após esse período, as culturas foram novamente centrifugadas, o

sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em um mesmo volume de solução de NaCl 0,9%.

Para medição da fluorescência, 200 µl de cada suspensão celular foram transferidos para uma placa de 96 poços e negra opaca de fundo transparente (Costar). Foram medidas a absorvância a 600 nm e a fluorescência com incidência a 479 nm e emissão a 520 nm, utilizando um leitor de placas *Spectramax Paradigm* (*Molecular Devices*). Uma vez que a absorvância a 600 nm é proporcional à concentração celular, a partir das medições, foram calculadas as razões de fluorescência/absorvância para cada cultura para garantir que as diferenças nos valores de fluorescência não se devem às diferenças na concentração celular. O experimento foi feito em triplicata.

3.11. Microscopia de fluorescência

Microscopia de fluorescência foi utilizada para observação de competições bacterianas e para a visualização da fluorescência produzida pela ativação do sistema SOS descrita no item 2.7. Para esses ensaios, as culturas e co-culturas de células foram adicionadas sobre um uma lâmina de vidro para microscopia com um *pad* de agarose (agarose 1,5%, meio 2xTY 20%), visando manter o crescimento celular sem interferir de forma significativa no passagem de luz. As imagens foram geradas em um microscópio Nikon Eclipse Ti no laboratório do Dr. Frederico José Gueiros Filho no IQ-USP. O microscópio é equipado com filtros para GFP (GFP-3035B-000-ZERO, Semrock) e RFP (TxRed-4040B, Semrock) e lente objetiva Nikon APO 100x. As imagens obtidas foram processadas usando o programa ImageJ.

3.12. Ensaio de atividade nuclease por degradação de plasmídeos

Células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram transformadas, com plasmídeos pET28a que codificam as proteínas analisadas: efetor (pET28a-XAC3266), efetor mutante (pET28a-XAC3266-H12Q) e vetor vazio (pET28a). As colônias transformantes foram inoculadas em meio autoindutor ZYP-5052 (1 % de triptona, 0.5 % de extrato de levedura, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM Mg_sO₄, 0.5 % de glicerol, 0.05 % glicose, 0.2 % de α-lactose) (STUDIER, 2005) suplementado com 50 µg/ml de canamicina, 30 µg/ml de cloranfenicol. Em paralelo, as mesmas cepas foram inoculadas em um meio ZYP-5052 modificado com glicose 0,2% substituindo a lactose, com o objetivo de tornar o meio repressor. As culturas foram mantidas a 37°C a 200 rpm por 15 horas. Após esse período de indução, as culturas foram normalizadas para a mesma DO. Foram coletadas alíquotas para verificação da indução das proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Também foram coletados 4 ml da cultura para extração do DNA plasmidial usando o kit de extração comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific).

Os produtos de extração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, e os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador para verificar a degradação das bandas correspondentes aos plasmídeos.

3.13. Ensaio de atividade nuclease *in vitro*

A atividade DNase de X-Tfe^{XAC3266} foi testada pela capacidade da proteína em degradar plasmídeos *in vitro*. Foram preparadas reações de atividade enzimática usando tampão com 10 mM de Tris pH7,6; 50 mM de NaCl e 2 mM ditioneitol (DTT). Foram testadas a adição de 5 mM de íons Mg²⁺, Ca²⁺ e Mn²⁺. Posteriormente o íon que obteve melhor resultado na degradação foi testado na concentração de 0,05mM, (mais próximo das condições fisiológicas) e também, contra o controle com adição de 50 mM de EDTA. Como substratos, foi utilizado o plasmídeo pNPTS138a em quantidade de 300 e 800 ng. O vetor foi previamente clivado com enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI* (pNPTS138a). Foi testada a ação X-Tfe^{XAC3266} em concentração de 33 µM e 3,3 µM em comparação com o mutante X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} nas mesmas concentrações. DNase I foi utilizada como controle positivo. Também foi testado o efeito inibidor de X-Tfi^{XAC3267} em concentração 3 vezes maior que o efector (115 µM e 11,5 µM) , incubando o inibidor com o efector por 2 minutos antes da adição ao meio reacional. Foi utilizada albumina de soro bovino (BSA, Amresco) em concentrações iguais à X-Tfi^{XAC3267}, como controle para a ação do inibidor. As reações foram realizadas em tubos de PCR de 200 µl a 30°C por 2 horas. Após esse período, os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para visualização dos plasmídeos.

4. Resultados

4.1. Desenho de um mutante no sítio ativo putativo de X-Tfe^{XAC3266}

Visando compreender a atividade enzimática de X-Tfe^{XAC3266}, buscamos a construção de plasmídeos que codificassem efetores com mutações em aminoácidos conservados do possível sítio catalítico do efector. Análises no banco de dados *Interpro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) indicam que X-Tfe^{XAC3266} possui um domínio conservado AHH da superfamília HNH/ENDO VII com atividade nuclease. Essa família de nucleases possui 4 histidinas conservadas, a primeira forma uma ligação com o um íon metálico, a segunda direciona uma molécula de água para a hidrólise da ligação fosfodiéster (ZHANG; IYER; ARAVIND, 2011).

Para identificar os resíduos conservados na região N-terminal com domínio AHH de X-Tfe^{XAC3266}, foi realizada uma busca por sequências similares utilizando a ferramenta JACKHMMER. A busca foi feita no banco de dados *Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>) usando a sequência dos aminoácidos de 6 a 91 e foram feitas duas iterações que encontraram 76 sequências. Mais da metade das sequências encontradas pertencem ao filo *bacteroidetes* (44), o segundo filo mais representado foi *proteobacteria* (19), seguido por *chloroflexi* (5). O logotipo com o empilhamento das sequências está apresentado na Figura 14.

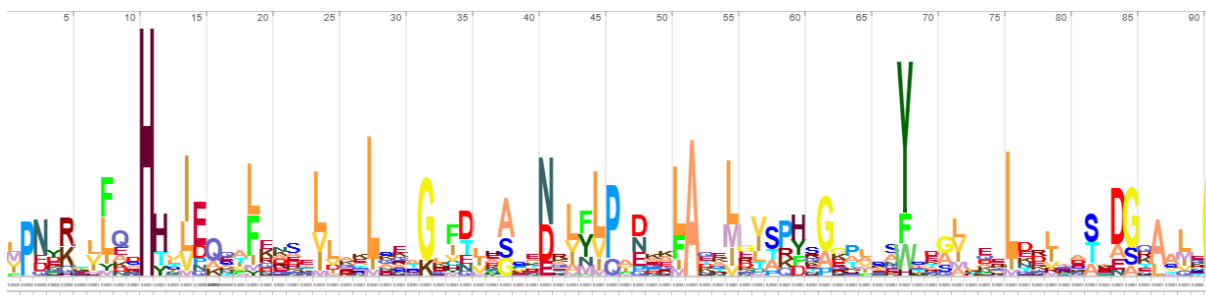


Figura 14: Logotipo de sequência obtido pela a partir do alinhamento de sequência de proteínas com correspondência de sequências com domínio AHH (6-91) de X-Tfe^{XAC326}. A altura do empilhamento indica a conservação da sequência em cada posição, enquanto a altura do símbolo indica a frequência relativa de cada aminoácido na posição.

É possível observar as histidinas conservadas ao analisar a assinatura do domínio AHH, especialmente a primeira histidina. Uma vez que a primeira histidina é importante na coordenação do íon metálico no sítio catalítico (ZHANG; IYER; ARAVIND, 2011), foram desenhados oligonucleotídeos com a substituição do códon referente a primeira histidina do domínio AHH em X-Tfe^{XAC3266} (H12) pelo códon de uma glutamina (Q). Esses oligonucleotídeos foram usados para construção de plasmídeos que codificam a proteína mutante Tfe^{XAC3266}_{H12Q}. É esperado que o efetor X-Tfe^{XAC3266} apresente atividade nuclease, e mutante H12Q não.

4.2. A expressão heteróloga de X-Tfe^{XAC3266} afeta o crescimento de *E. coli*

Para avaliar o possível efeito tóxico de X-Tfe^{XAC3266} em bactérias Gram-negativas foram feitas curvas de crescimento de célula de *E. coli* que expressam o efetor. Foram utilizadas cepas de *E. coli* DH5α contendo plasmídeos pBRA que codificam o efetor, o par efetor-inibidor (X-Tfe^{XAC3266}-X-Tfi^{XAC3267}), o efetor mutante (Tfe^{XAC3266}_{H12Q}) e o plasmídeo vazio. As cepas foram crescidas em meio contendo os antibióticos adequados e 0,4% de glicose para inibir a expressão das

proteínas. As culturas tiveram suas DO normalizadas e foram inoculadas em meio líquido sob agitação e a temperatura de 30°C. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela medida de absorvância a 600 nm ao longo do tempo. Após 135 minutos, foi adicionado arabinose a 0,1% para induzir a expressão das proteínas. Paralelamente, também foram feitas curvas de crescimento sem a adição de arabinose. Os valores de absorvância em função do tempo são mostrados na Figura 15.

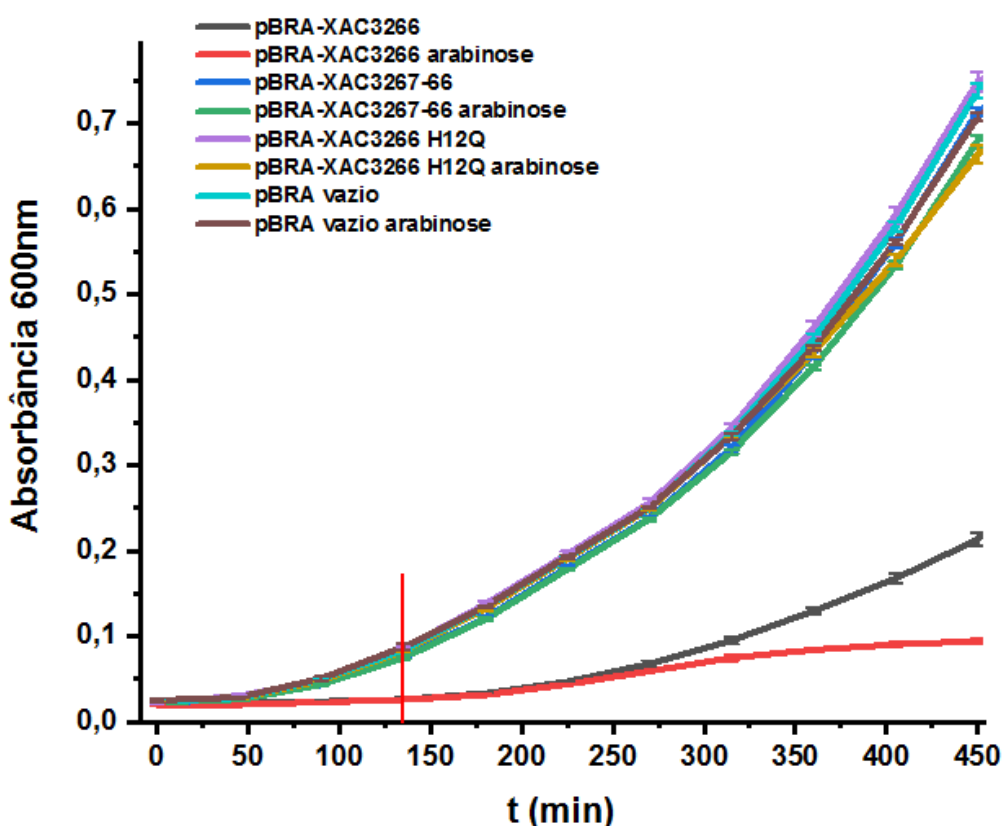


Figura 15: Curva de crescimento de cepas de *E.coli* DH5α em meio 2xTY portando os vetores para a expressão das proteínas analisadas. As cepas usadas no ensaio foram inoculadas em meio 2xTY com 0,4% de glicose, espectinomicina 100 µg/ml e foram cultivadas a 37°C e 200 rpm por 14 horas. As culturas foram usadas para reinocular meio 2xTY com espectinomicina 100 µg/ml a partir de uma DO_{600nm} de 0,05 e cultivadas sob as mesmas temperaturas e agitação iniciais. O crescimento foi medido através da absorvância a 600 nm. A linha vertical vermelha indica o tempo (135 min) no qual foi adicionada arabinose à 0,1%. As curvas representam as culturas de células portando os diferentes vetores. Preto: efetor (pBRA-XAC3266) induzido; vermelho: efetor (pBRA-XAC3266) não induzido; azul: inibidor/efetor (pBRA-XAC3267-3266) não induzido; verde: inibidor/efetor (pBRA-XAC3267-3266) induzido; roxo: efetor mutante (pBRA-XAC3266-H12Q) não induzido; amarelo: efetor mutante (pBRA-XAC3266-H12Q) induzido; turquesa: vetor vazio (pBRA) não induzido; marrom: vetor vazio (pBRA) induzido

Foi possível observar que a expressão do efetor tipo selvagem teve o crescimento grandemente prejudicado quando comparado com o controle. Enquanto as culturas que expressavam o inibidor juntamente com o efetor, bem como as que expressavam a efetor mutante, apresentaram crescimento semelhante ao controle com vetor vazio. Isso indica que X-Tfe^{XAC3266} possui atividade tóxica, inibindo o crescimento de *E. coli* DH5 α . Também indica que a histidina 12 é fundamental para a atividade da proteína uma vez que o mutante não afetou o crescimento da bactéria. Além disso, o fato do par efetor-inibidor não interferir no crescimento da bactéria ao ser expresso, corrobora a hipótese de que X-Tfi^{XAC3267} é o inibidor de X-Tfe^{XAC3266}.

As duas culturas, induzida e não induzida, apresentam considerável redução de crescimento em relação aos controles. Isto reflete observações anteriores do nosso grupo (dados não mostrados) que proteínas sob controle do promotor pBAD no vetor pBRA são expressas, ainda que em quantidades menores, mesmo na ausência de arabinose.

Para confirmar o efeito tóxico de indução, também foram feitas curvas de crescimento usando células expressando o efetor a partir de uma clonagem em vetor pET28a. Primeiramente buscou-se fazer curvas de crescimento utilizando *E. coli* BL21(DE3). Entretanto, verificou-se que a expressão do efetor não apresentava nenhum efeito sobre o crescimento das culturas. Além disso, a presença do efetor não era detectada quando se fazia SDS-PAGE das culturas. É possível especular que, devido ao efeito tóxico do efetor e a maior expressão pelo vetor pET28a, tenham sido selecionadas células com plasmídeos com mutações que impedem a expressão do efetor.

Visando contornar o problema de expressão, foram usadas cepas *E. coli* BL21(DE3)pLysS, cujo plasmídeo pLysS previne a expressão basal da proteína de

interesse (este efeito é devido ao gene neste plasmídeo que codifica para a lisozima do fago T7 que, por sua vez inibe a RNA polimerase do fago T7). As cepas foram transformadas com plasmídeos pET28a que codificam o efetor (pET28a-XAC3266) e o efetor com mutação no possível sítio catalítico (pET28a-XAC3266-H12Q). Como controle positivo, foi usado o vetor vazio. As colônias transformantes foram inoculadas em meio autoindutor (item 3.1.5), que inibe a expressão até que se inicie a fase de indução. As curvas de crescimento foram feitas a temperatura ambiente sob agitação e a densidade óptica das amostras foi acompanhada por um período de doze horas. Os valores de DO por tempo estão representados no gráfico da Figura 16.

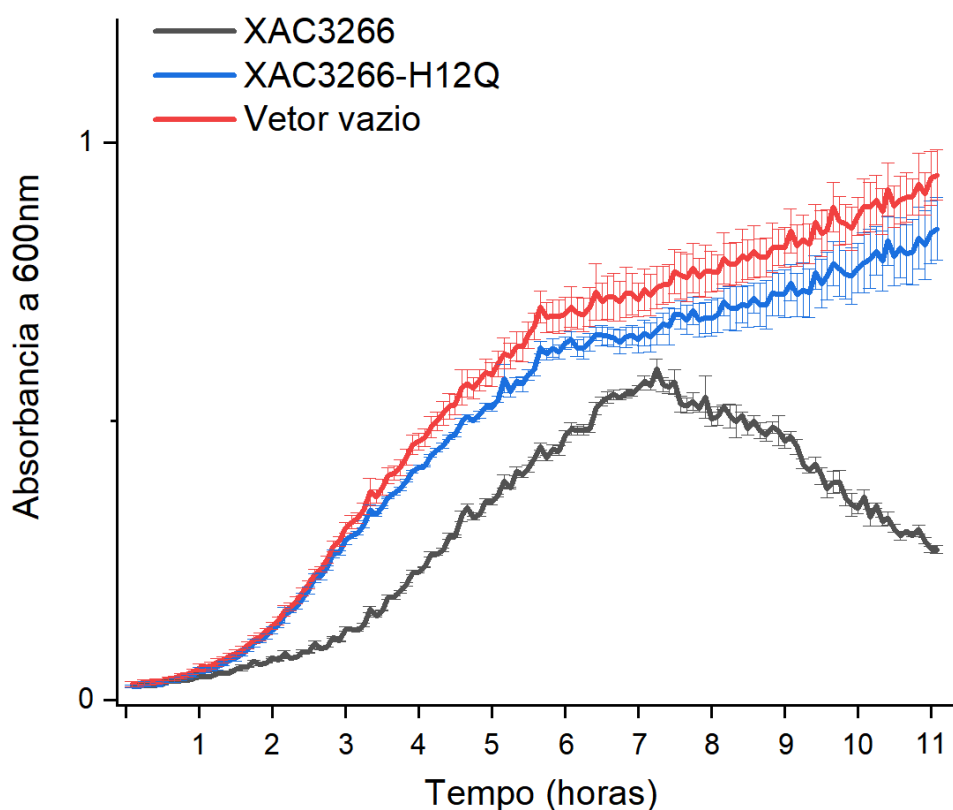


Figura 16: Curva de crescimento de cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS portando os vetores para as proteínas analisadas em meio autoindutor ZYP-5052. As cepas usadas no ensaio foram inoculadas em meio autoindutor contendo espectinomicina 100 µg/ml e foram cultivadas a 37°C e 200 rpm por 11 horas. O crescimento foi medido através da absorbância a 600 nm. As curvas representam as diferentes culturas. Preto: efetor (pBRA-XAC3266); azul: efetor mutante (pBRA-XAC3266-H12Q); vermelho: vetor vazio (pBRA).

Nas curvas de crescimento, é possível observar uma inflexão no gráfico de densidade óptica da cepa com vetor que codifica o efetor, X-Tfe^{XAC3266}, após 7 horas de crescimento. Essa inflexão na curva de crescimento evidencia o efeito tóxico da proteína, que provoca morte celular. O mesmo efeito não ocorre com a curva da cultura que expressa o mutante X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}, que tem um padrão de crescimento próximo ao do controle com vetor vazio. Apesar da curva da cepa que expressa o efetor tipo selvagem apresentar um valor de densidade óptica menor que as outras, todas as curvas apresentam crescimento até 7 horas, quando ocorre a inversão da curva da cepa expressando o efetor tipo selvagem.

4.3. X-Tfi^{XAC3267}/X-Tfe^{XAC3266} é um par efetor/inibidor do X-T4SS

Uma vez que o sistema de secreção do tipo IV é usado para matar bactérias competidoras, é natural imaginar que X-Tfe^{XAC3266}, cujo efeito tóxico foi demonstrado no item 3.1, confira uma vantagem à *X. citri* em competição contra outras bactérias de forma dependente do X-T4SS. Para verificar essa hipótese, foram realizados ensaios de competição de *X. citri* contra cepas de bactérias Gram-negativas (SOUZA et al., 2015).

Foram usadas no experimento as cepas de *X. citri* $\Delta 8$ (nocaute para os genes de todos os pares efetor/inibidor exceto X-Tfi^{XAC3267}/X-Tfe^{XAC3266}) e $\Delta 9$ (nocaute para todos os pares efetor/inibidor) visando avaliar o efeito de X-Tfe^{XAC3266} em competição. A cepa de *X. citri* tipo selvagem (WT) foi usada como controle positivo e a cepa $\Delta virB7$ (mutante nocaute de *virB7*, cujo X-T4SS não é funcional) como controle negativo. Também foi usada a cepa $\Delta 3266/3267$ (deficiente somente do par efetor

inibidor Tfi^{XAC3267}/Tfe^{XAC3266}) para avaliar se o efector depende da atividade de algum deles para manifestar sua atividade.

Culturas de células de de *X. citri* (WT, Δ 3266/3266 Δ 8, Δ 9, Δ virB7) foram co-cultivadas com *E. coli* MG1655 em meio sólido por 18. Após esse período, as células foram ressuspensas e, em seguida, foram feitas diluições seriadas da suspensão dessas culturas. As células foram, então, plaqueadas em duas placas com meios seletivos distintos, visando selecionar cepas doadoras e receptoras. A cepas doadoras (*X. citri*) foram selecionadas em meio 2xTY com 1,5% de ágar e 100 μ g/ml de ampicilina 100 μ g/ml de espectinomicina e incubadas à 30°C. Já as culturas de bactérias receptoras, foram pipetadas em meio 2xTY com 1,5% de ágar com 50 μ g/ml de X-gal e 80 μ g/ml de IPTG (*E. coli* MG1655 expressa Beta-galactosidase levando a clivagem de X-gal e, conseqüentemente, a o aparecimento de coloração azulada nas colônias) e incubadas à 37°C. As unidades formadoras de colônia foram contadas e foi determinado os valores de CFU/ml. Com esses valores foram calculadas a razão de CFU/ml entre *X. citri* e as cepas alvo antes e após o período de competição (co-cultura) para cada cepa de *X. citri* testada (Figura: 17). O experimento também foi realizado utilizando *Pseudomonas aeruginosa* PA14 como cepa alvo, nas mesmas condições.

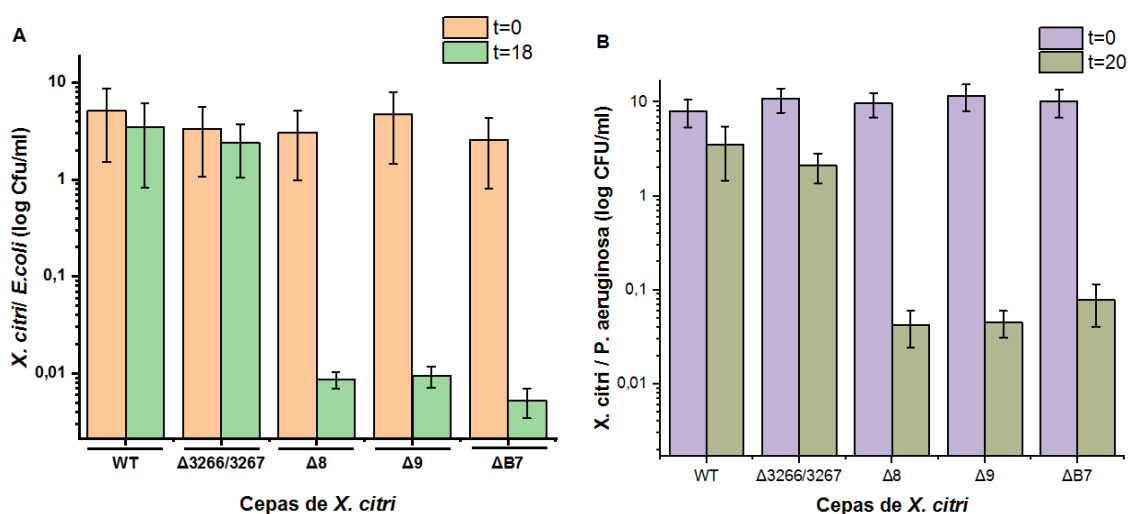


Figura 17: Competição entre cepas de *X. citri* e *E. coli* MG1655 (A) e *P. aeruginosa* (B). As células de *X. citri* foram cultivadas por 24 horas a 37°C a 200 rpm em meio 2xTY com 100 µg/ml de ampicilina. Reinoculadas em meio idêntico e cultivadas nas mesmas condições por 12 horas. Paralelamente, *E. coli* MG1655 ou *P. aeruginosa* PA14 foram inoculadas em meio 2xTY e cultivadas por 12 horas a 37°C e agitação de 200 rpm. Em seguida, o meio de todas as cepas foi trocado por 3 vezes. A densidade óptica das culturas foi normalizada, e as cepas doadoras e receptoras foram misturadas com uma DO₆₀₀ final de 1 para as cepas doadoras/atacantes e 0,5 para as cepas receptoras/alvo. 5 µl de cada mistura foi pipetada em meio 2xTY com 1,5% de ágar e mantidas à temperatura de 30°C por 18 horas. Após esse período, as células foram ressuspensas em 2 ml de solução de NaCl 0,9% da qual, foi feita uma diluição seriada. As diluições foram plaqueadas, paralelamente em placas com meio 2xTY com 1,5% de ágar com ampicilina 100 µg/ml e espectinomicina 100 µg/ml para seleção das células doadoras/atacantes e placas 50 µg/ml de X-gal e 80 µg/ml de IPTG para seleção das células receptoras/alvo. A capacidade competir com as bactérias alvo foi medida pela razão entre o valor de unidades formadoras de colônia por ml de *X. citri* pelo da bactéria competidora. O eixo das abscissas apresenta as cepas de *X. citri* utilizadas. WT: *wild type*; Δ3266/3267: cepa deficiente do par efetor inibidor 3266-67; Δ8: cepa deficiente de todos os pares efetor/inibidor exceto Tfi^{XAC3267}/Tfe^{XAC3266}; Δ9: cepa sem nenhum par efetor/inibidor; Δ*virB7*: T4SS não funcional. As barras indicam a razão doadora/receptora. A cor salmão para o tempo 0 e as verdes para o tempo de 18 horas da competição com *E. coli*. As barras roxas tempo 0 e cinza 20 horas para *P. aeruginosa*.

Como demonstrado em estudos anteriores, *X. citri* tipo selvagem apresentou uma elevada capacidade de matar *E. coli* e *P. aeruginosa*, comparada à cepa sem X-T4SS ativo, Δ*virB7*. Entretanto, não houve diferença significativa na capacidade de matar os alvos entre as cepas Δ8, Δ9 e Δ*virB7*. Portanto, não foi possível demonstrar nenhuma vantagem conferida pelo efetor à *X. citri* em competição contra as cepas recipientes testadas, nas condições em que foram realizados os experimentos. Também não observamos diferença significativa entre *X. citri* selvagem e a cepa nocaute para X-Tfi^{XAC3267}/X-Tfi^{XAC3266}. Não tendo sido possível observar, portanto, ação tóxica do efetor decorrente de sinergia com os demais efetores de do T4SS de *X. citri*.

Foi levantada a hipótese de que X-Tfe^{XAC3266} teria efeito contra espécies de bactérias taxonomicamente afins. Decidimos, então, avaliar se o efetor teria atividade em uma competição entre cepas da *X. citri* contra mutantes de *X. citri* que não possuem proteção contra a ação tóxica dos efetores do X-T4SS. Por esta razão, foi feita uma competição utilizando como alvo uma cepa mutante de *X. citri* que, além

de ser nocaute para todos os genes dos pares efetor-inibidor do T4SS, fosse nocaute para o gene *xac2611*. Esse gene no mesmo *locus vir* (*xac2611*) codifica uma proteína que atua como um inibidor geral do sistema, protegendo contra ataques de células irmãs (Gabriel Oka e Shaker Chuck Farah; dados não publicados). A cepa modificada por Gabriel Oka (não publicada), nomeada *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ foi usada em competição contra as cepas de *X. citri* WT, $\Delta 8$, $\Delta 9$ e $\Delta virB7$.

As cepas doadoras (WT, $\Delta 8$, $\Delta 9$ e $\Delta virB7$) foram transformadas com um plasmídeo que codifica uma proteína fluorescente verde (pBBR-GFP), enquanto a cepa recipiente ($\Delta 9\Delta 2611$) foi transformada com um plasmídeo que codifica uma proteína fluorescente vermelha (pBBR-RFP). Adicionalmente, todas as cepas foram transformadas com um plasmídeo pBRA-vazio.

Todas as cepas foram cultivadas conforme descrito no item 2.5, e em seguida, as cepas doadoras e receptoras foram misturadas em proporções iguais em uma densidade óptica final de 1. A mistura foi adicionada em uma lâmina de microscopia com uma almofada feita de 1,5% de agarose em 20% de meio 2xTY e 100 $\mu\text{g/ml}$ de espectinomicina. As competições foram observadas em microscópio de fluorescência por 8 horas. Durante a competição foi possível observar que as células de *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ que não estavam em contato com células de *X. citri* $\Delta 8$ se multiplicaram normalmente, enquanto as células que estavam em contato com as células de *X. citri* $\Delta 8$ não se duplicavam como demonstrado na Figura 18a.

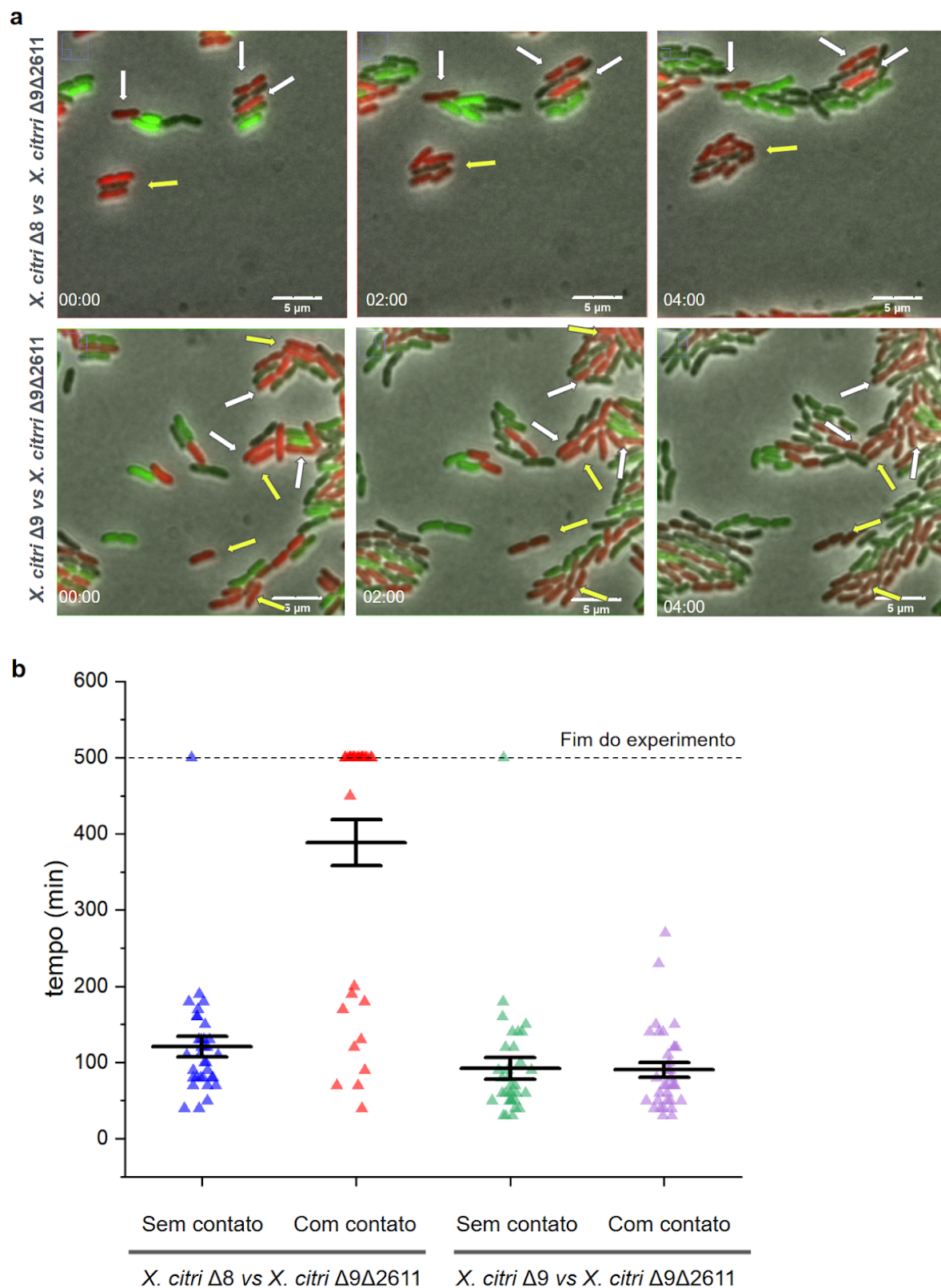


Figura 18: Efeito de X-TfeXAC3266 sobre duplicação de células de *X. citri* em competição. As células foram cultivadas por 24 horas a 37°C a 200 rpm em meio 2xTY com 100 µg/ml de espectinomicina. Reinoculadas em meio idêntico e cultivadas nas mesmas condições por 12 horas. Em seguida, o meio foi trocado 3 vezes por um processo de centrifugação e ressuspensão para remoção dos antibióticos. A densidade óptica das culturas foi normalizada, e as cepas doadoras e receptoras foram misturadas para uma DO final de 1. 1

μ l de cada mistura foi adicionada à uma lâmina de microscopia com *pad* de 2xTY 20%, agarose 1,5% e 100 μ g/ml de espectinomicina. As culturas foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti com filtros para GFP e RFP. **(a)** Imagens representativas de microscopia de fluorescência de série temporal de ensaios de competição bacteriana. A cepa alvo, *X. citri* Δ 9 Δ 2611, em vermelho; cepa atacante, em verde, *X. citri* Δ 8 (superior) ou *X. citri* Δ 9 (inferior). As setas brancas indicam células alvo que estão em contato com as células atacantes e as setas amarelas indicam células recipientes que não estão em contato com as atacantes. As imagens apresentam os campos observados nos tempos 0, 2 horas e 4 horas. **(b)** Tempo de duplicação celular das células de *X. citri* Δ 9 Δ 2611. Durante 8 horas foram observadas 12 células de 3 campos de observação para cada competição, totalizando 36 células de cada competição. Foram comparadas o tempo passado antes da duplicação de células de *X. citri* Δ 9 Δ 2611 em contato com *X. citri* Δ 8 e *X. citri* Δ 9 com as células que não estavam em contatos com essas cepas. A linha tracejada marca o final do experimento. As células nesta linha não se duplicaram até o final do experimento.

A partir dessa observação, foi possível comparar o tempo de duplicação de células de *X. citri* Δ 9 Δ 2611 que estavam em contato com a célula atacante com as células que não estavam em contato com a atacante (Figura 18b). Foi possível constatar que a maior parte das células que estiveram em contato com *X. citri* Δ 8 não se duplicaram até o fim do experimento, sendo atribuído como tempo de duplicação dessas células o tempo final do ensaio. Enquanto isso, as células Δ 9 Δ 2611 que não estavam em contato se multiplicaram normalmente (em média cada 120 min). Esta diferença não foi verificada nas competições contra *X. citri* Δ 9, que apresentou tempo de duplicação igual entre células que estavam em contato com as células doadoras e células que não estavam em contato.

Uma vez observado o efeito de X-Tfe^{XAC3266} em competição através de análises de microscopia, foi feito um ensaio de competição com posterior contagem de unidades formadoras de colônia para obter uma análise mais ampla do efeito. Para isso, foi feita uma competição com a mesma metodologia descrita no item 3.3, usada para competições contra *E. coli* (meio 2xTY com 1,5% de ágar e incubação à 37°C). Como a cepa alvo de *X. citri* tem crescimento mais lento que *E. coli*, o tempo de competição foi adaptado de 18 para 40 horas. Também foi alterado o meio

seletivo usados para recuperar as células foram modificados para selecionar a cepa *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ (meio 2xTY com 20 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de espectinomicina, e a placa foi incubada à 30°C).

Entretanto, ao contrário dos ensaios de microscopia, não foi possível verificar o efeito deletério causado pelo efetor nos ensaios de competição bacteriana. Uma das hipóteses para essa diferença entre experimentos é que o efetor não confere vantagem competitiva contra a cepa alvo nas condições testadas no experimento de contagem de colônias. Outra hipótese é que, embora o efetor traga uma vantagem competitiva para a *X. citri*, o experimento não gera uma diferença detectável no número de colônias, nas condições testadas.

Uma vez que, o efeito observado em microscopia não estava sendo reproduzido quando feita a contagem de unidades formadoras de colônias, buscou-se realizar o experimento nas exatas mesmas condições da microscopia. Para isso, os experimentos de competição foram repetidos a uma temperatura de 22°C, usando uma placa de petri com meio 2xTY 20% com 1,5% agarose.

Uma vez que as cepas utilizadas expressam proteínas fluorescentes, após a o período de competição a placa onde as células foram incubadas foi analisada em um fotodocumentador com leitor de fluorescência. A imagem das culturas em competição apresentou diferença de coloração dependendo de qual cepa predominou durante a competição, como pode se ver na Figura 19a.

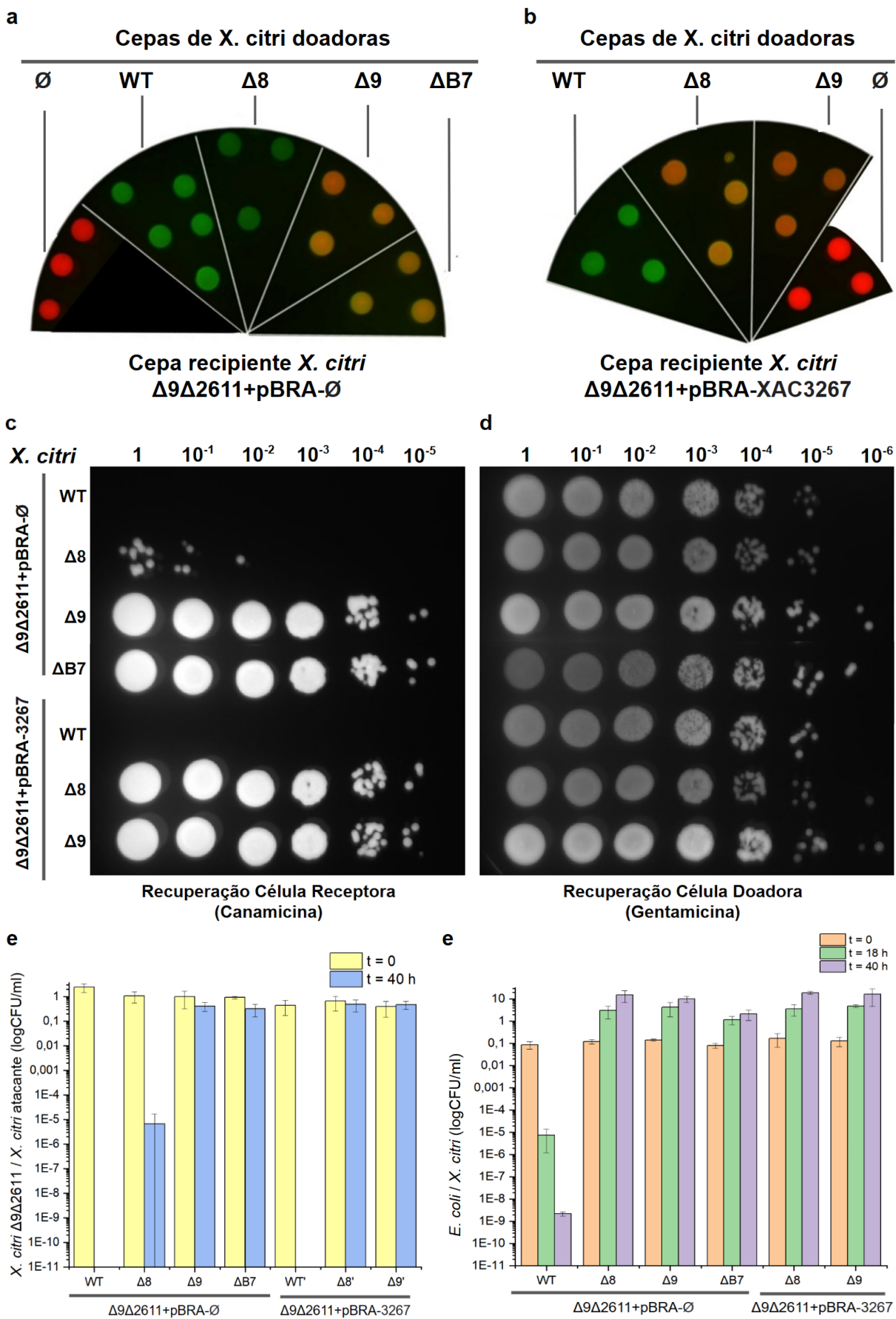


Figura 19: Efeito competitivo de X-Tfe^{XAC3266}. Fluorescência de cocultura de *X. citri* WT, $\Delta 8$, $\Delta 9$ e $\Delta B7$ (expressam GFP) contra *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ +pBRA- \emptyset (a) e *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ +pBRA-3267 (expressam RFP) (b). As células foram cultivadas por 24 horas a 37°C a 200 rpm em meio 2xTY com 100 $\mu\text{g/ml}$ de espectinomicina. Reinoculadas em meio idêntico e cultivadas nas mesmas condições por 12 horas. Em seguida, o meio foi trocado por 3 vezes. A densidade óptica das culturas foi normalizada, e as cepas doadoras e receptoras foram misturadas para uma DO final de 1 para cada cepa. 5 μl de cada mistura foi pipetada em meio 2xTY 20%, agarose 1,5% e 100 $\mu\text{g/ml}$ de espectinomicina e mantidas à temperatura ambiente por 40 horas. As placas foram analisadas em fotodocumentador ChemiDoc com os filtros para Dylight 488 e Dylight 550. As células foram ressuspensas em 2 ml de solução de NaCl 0,9% da qual, foi feita uma diluição seriada. As diluições foram plaqueadas, paralelamente em placas com meio 2xTY sólido com gentamicina e ampicilina para seleção das células doadoras e canamicina e ampicilina para seleção das células receptoras. Placas com células recuperadas após a competição: (c) *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ e (d) *X. citri* WT, $\Delta 8$, $\Delta 9$ e $\Delta B7$. (e) e (f): Razão de CFU/ml de células receptoras/doadoras para competição contra *E. coli* MG1655 (f) e *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ (g).

Na Figura 19a e na Figura 19b é possível observar a diferença de coloração entre as diferentes competições. Uma vez que as cepas doadoras dos efetores expressam proteína fluorescente verde, quando essa cepa prevalece no meio competitivo o aglomerado de colônias apresenta cor verde. Como a célula recipiente expressa proteína fluorescente vermelha, quando as cepas doadoras não forem capazes de prevalecer contra a receptora, é esperado que as populações estejam em equilíbrio, e o aglomerado de colônias apresente uma coloração alaranjada. Dessa forma, a coloração do aglomerado varia conforme a proporção de células doadoras e receptoras.

No experimento, a competição cuja cepa doadora era *X. citri* $\Delta 8$ apresentou a coloração verde, semelhante à *X. citri* tipo selvagem (controle positivo), mostrando que *X. citri* $\Delta 8$ consegue prevalecer contra *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$, da mesma forma que a cepa tipo selvagem. Já o aglomerado cuja cepa doadora era *X. citri* $\Delta 9$ apresentou coloração alaranjada, similar ao controle negativo ($\Delta virB7$). Isso mostra que, sem a presença do efector, a cepa doadora não prevalece sobre a cepa receptora.

Uma vez que o nível de fluorescência de linhagens distintas pode variar, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia dos ensaios de

competição. Os aglomerados das co-culturas foram ressuspensos, foi realizada a diluição seriada e pipetagem em meio seletivo para separar células doadoras e receptoras (Figura 19c e 19d). Desta forma, foi possível avaliar a proporção de doadoras e receptoras nas competições através do cálculo da razão entre CF para cada cepa. Como isso, averiguou-se de forma quantitativa a contribuição de X-Tfe^{XAC3266} para o efeito antibacteriano do T4SS de *X. citri* (Figura 19e e 19f).

Foi possível observar que X-Tfe^{xac3266} confere uma forte vantagem a *X. citri* em competição contra *X. citri* Δ 9 Δ 2611. A razão receptora:doadora foi milhares de vezes menor em competições na cepa que possui o gene que codifica o efetor (*X. citri* Δ 8) do que com a que não possui esse gene (*X. citri* Δ 9), como mostrado no gráfico da Figura 19f. Também é menor que *X. citri* sem T4SS funcional (*X. citri* Δ B7), indicando que o efeito do efetor depende do sistema de secreção do tipo IV. Já quando a competição foi realizado contra a cepa *X. citri* Δ 9 Δ 2611 transformada com plasmídeo pBRA-XAC3267, que codifica o inibidor, o efeito de efetor desaparece. Esses resultados indicam que X-Tfe^{XAC3266} é um efetor do sistema de secreção do tipo IV de *X. citri* e que X-Tfi^{XAC3267} é o seu inibidor cognato.

4.4. X-Tfe^{XAC3266} possui atividade nuclease e X-Tfi^{XAC3267} é o seu inibidor

4.4.1. X-Tfe^{XAC3266} ativa a resposta SOS de *E. coli*

Uma vez que a contribuição vantajosa de X-Tfe^{XAC3266} como efetor do sistema de secreção do tipo IV em ensaios de competição bacteriana foi estabelecida, buscou-se confirmar se a proteína apresenta atividade nuclease, como predizem as análise de bioinformática.

A fim de investigar a possível atividade DNase do efetor, foi avaliada a capacidade do mesmo de ativar a resposta SOS, que é uma resposta global ao dano no DNA em bactérias. Para isso foi usada uma cepa de *E. coli* BW25113 contendo o plasmídeo pSC101-PrecA::GFP (RONEN et al., 2002), que codifica o gene de GFP sob controle do promotor recA. Esta cepa emite fluorescência quando a resposta SOS é ativada, assim funcionando como um repórter para dano ao DNA.

Realizando expressão heteróloga de X-Tfe^{XAC3266} com vetor induzido por arabinose (pBRA-XAC3266), foi possível observar, por microscopia de fluorescência, a ativação da resposta SOS comparável à do controle positivo usando uma concentração subletal de ciprofloxacino. Enquanto isso, a expressão do mutante X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} não gerou fluorescência superior ao controle negativo, com vetor vazio. O uso do vetor que codifica o efetor junto com o seu inibidor cognato (pBRA-XAC3267-3266) não apresentou fluorescência. Imagens de microscopia de fluorescência representativas dos experimentos podem ser vistas na Figura 20.

Para as mesmas culturas foi possível quantificar a ativação da resposta SOS através da medição da fluorescência em um leitor de placas. As culturas, após duas horas de indução com arabinose 0,1%, foram transferidas para uma placa de cultura de 96 poços, e foi feita uma diluição seriada das culturas (2x em cada passo) . Em seguida, foi medida a absorbância a 600 nm e a fluorescência para GFP. Foi, então, calculada a razão fluorescência/absorbância, buscando a densidade óptica que apresentava a maior razão. Uma DO_{600nm} de 0,2 apresentou a maior fluorescência em relação à concentração celular.. As culturas tiveram sua DO_{600nm} normalizada para o valor de 0,2 e a fluorescência de cada cultura foi mensurada. Os valores de fluorescência são apresentados na Figura 20b. Paralelamente aos experimentos de expressão heteróloga induzida por arabinose de X-Tfe^{XAC3266},

X-Tfe^{XAC3266}+X-Tfe^{XAC3267} e X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}, foram feitos experimentos usando glicose ao invés de arabinose para inibir a expressão do efector.

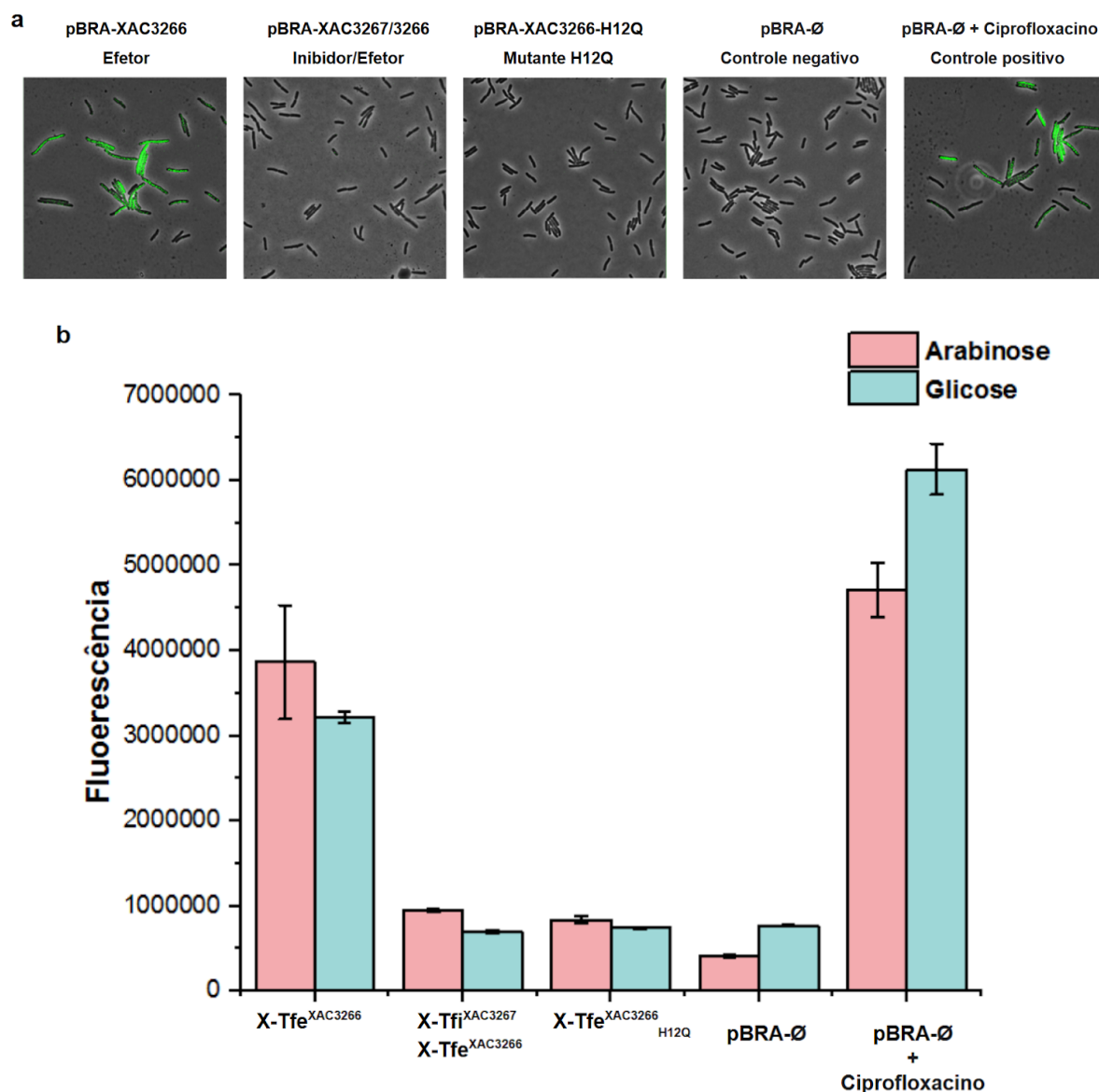


Figura 20: Ativação de resposta SOS em *E. coli* mediante ação de X-Tfe^{XAC3266}. A ativação do sistema SOS foi avaliada para a expressão da toxina (XAC3266), do par toxina-antitoxina (XAC3267-3266), do mutante da toxina (XAC3266H12Q), do vetor vazio (pBRA) e do vetor vazio na presença de ciprofloxacino 0,5ug/ml (Cipro). Foi usada uma cepa de *E. coli* BW25113 portando o plasmídeo repórter pSC101-PrecA::GFP, que codifica o gene da proteínas GFP sob o controle do promotor recA. As culturas foram crescidas durante a noite, re-inoculadas, paralelamente, em meio com arabinose 0,1% e glicose 0,4% por 1,5 horas e, em seguida, lavadas e ressuspensas em solução de NaCl 0,9%. **(A)** Microscopia de fluorescência das culturas com indução por arabinose. **(B)** Após normalizadas para a DO de 0,2 e a fluorescência foi medida por um leitor de placas com comprimento de onda de emissão e detecção de 479 nm e 520 nm, respectivamente.

A medição dos níveis de fluorescência das culturas, assim como as imagens de microscopia, demonstram que X-Tfe^{XAC3266} induz a resposta SOS, enquanto o efetor na presença do inibidor (X-Tfi^{XAC3267}) e o efetor mutante apresentam níveis similares ao controle negativo. As culturas que expressavam os efetores, quando induzidas com arabinose, tiveram valor de fluorescência ligeiramente maior que as e reprimidas com glicose. Como já demonstrada nas curvas de crescimento, o vetor pBRA apresenta uma expressão basal do gene sob controle do promotor pBAD, mesmo na presença de glicose.

4.4.2. X-Tfe^{XAC3266} é capaz de degradar DNA plasmidial *in vivo*

Embora o ensaio de ativação SOS tenha apontado a possibilidade que X-Tfe^{xac3266} tem uma atividade DNase, uma vez que ativa a via de reparo, foi buscado uma evidência mais direta dessa atividade. Para isso, foram feitos ensaios buscando ver a degradação de plasmídeos provocada pela expressão heteróloga do efetor.

Cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS carregando o vetor pET28a contendo o gene que codifica o efetor ou o efetor mutante foram inoculadas em meio autoindutor ZYP-5052 e cultivadas a 37°C sob agitação de 200 rpm por 15 horas. O DNA plasmidial foi extraído para avaliação do estado de degradação por eletroforese em gel de agarose.

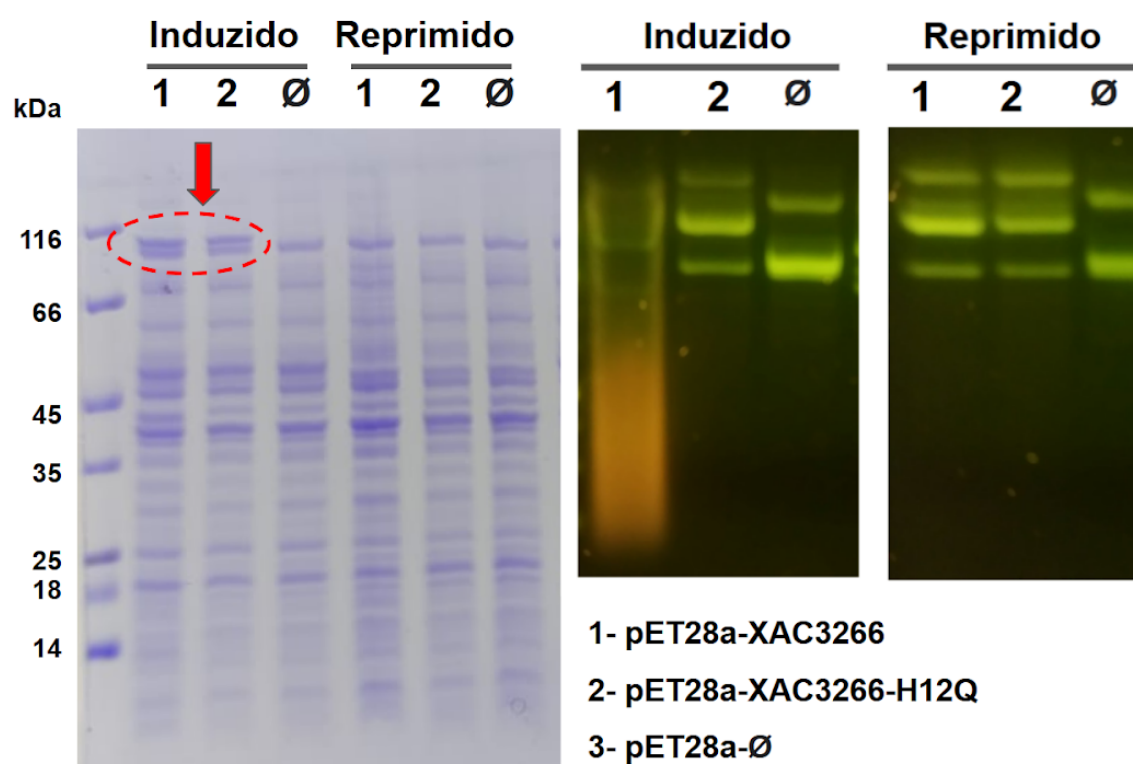


Figura 21: Degradação de plasmídeo por expressão heteróloga de X-Tfe^{XAC3266} em *E. coli*. Colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS portando vetor pET28a codificando as proteínas de interesse foram inoculadas em meio ZYP-5052 com lactose 0,2% (induzido) ou glicose 0,2% (reprimido) e cultivadas à 37° a 200 rpm por 15 horas. *Esquerda:* SDS-PAGE de cada cultura bacteriana. *Direita:* Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial extraído de cada cultura cultivada em meio autoindutor ZYP-5052 e meio ZYP-5052 modificado (com glicose em vez de lactose, para reprimir a expressão do plasmídeo). Os plasmídeos codificam os genes X-Tfe^{XAC3266} (1), X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} (2). O vetor vazio foi usado como controle (Ø). A seta vermelha indica as bandas referentes às proteínas cuja expressão foi induzida.

Para verificar se as proteínas estavam sendo expressas durante o experimento, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras das culturas. No gel é possível observar as bandas referentes às proteínas X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} nas culturas induzidas (peso molecular teórico de X-Tfe^{XAC3266} e de X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} é de 94 kDa), enquanto as mesmas bandas não se encontram presentes nas culturas reprimidas (Figura 21, esquerda).

Foi observado que o DNA plasmidial purificado das cepas com vetor pET28a codificando X-Tfe^{XAC3266} apresentou um borrão (*smear*) no gel de agarose, quando induzido. Isto é indicativo da degradação do DNA (Figura 21, direita). Porém,

nenhuma evidência de degradação do plasmídeo expressando o mutante X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} foi observada (Figura 21, direita). Os experimentos foram realizados comparando culturas com vetor pET28a em meio autoindutor com as mesmas cepas crescendo em um meio semelhante ao meio autoindutor ZYP-5052, com exceção de que possui glicose em lugar de lactose, para reprimir a expressão do efector. Nestas condições de crescimento, nenhuma das culturas apresentou sinal de degradação (Figura 21, direita).

Estes experimentos apontam que X-Tfe^{XAC3266} tem a capacidade de provocar a degradação de DNA plasmidial *in vivo*, enquanto a mutação da histidina do sítio catalítico abole esse efeito. Isto indica que o efector apresenta atividade DNase.

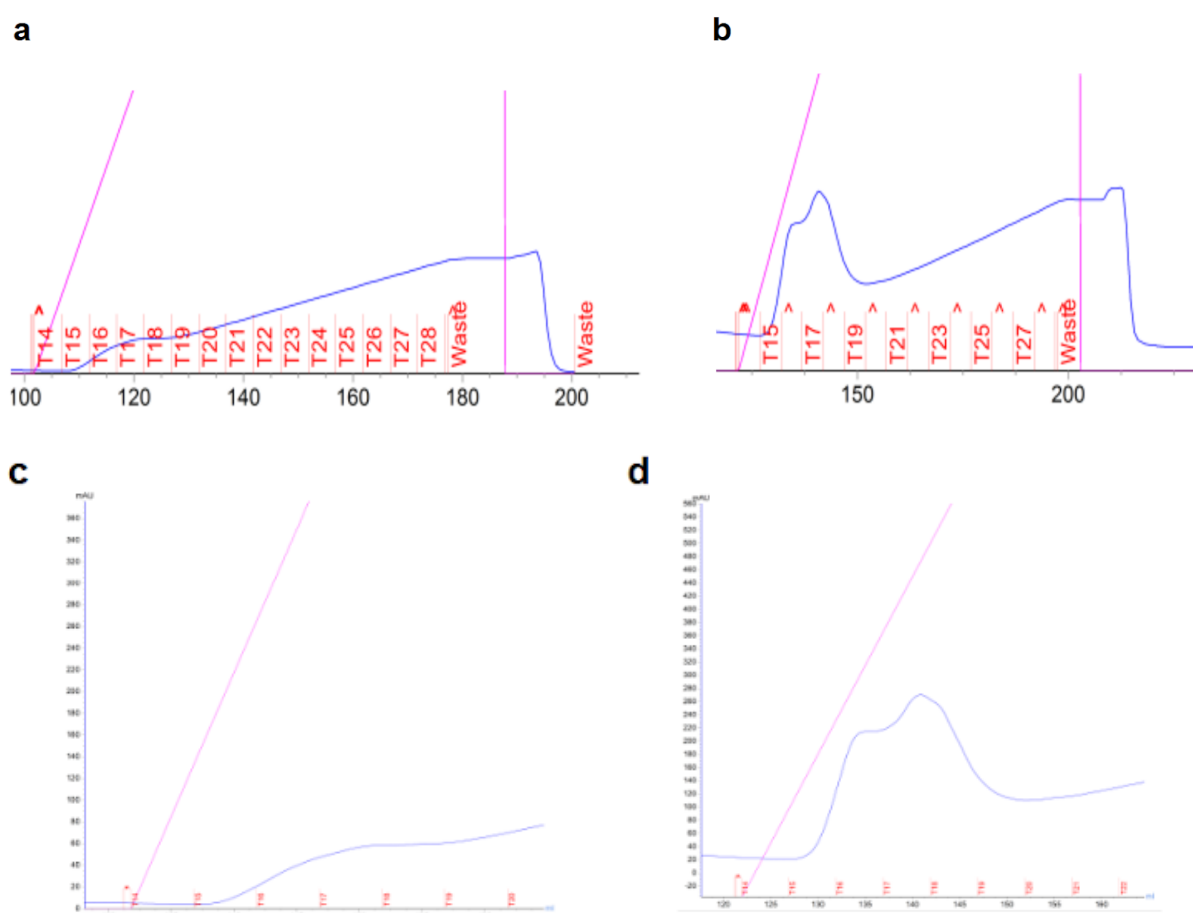
4.5. Caracterização Bioquímica de X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfi^{XAC3267}

4.5.1. Purificação de X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfi^{XAC3267}

Com o objetivo demonstrar que a degradação de DNA provocada por X-Tfe^{XAC3266} é causada pela ação direta do efector, foi feita a purificação da proteína e sua caracterização bioquímica *in vitro*.

Uma vez que a expressão de X-Tfe^{XAC3266} é bastante deletéria para o crescimento de *E. coli*, foi repetida a estratégia usada para os ensaios de degradação de plasmídeos *in vivo*, empregando cepas de *E. coli* com plasmídeo pLysS e meio autoindutor. Cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS portando os plasmídeos pET28a-XAC3266 e pET28a-XAC3266-H12Q (ambos com cauda de poli-histidina na região N-terminal para permitir purificação das proteínas por cromatografia de afinidade) foram cultivadas em meio autoindutor ZYP-5052. As

culturas foram centrifugadas, as células foram ressuspensas em tampão de lise e submetidas à sonicação (vide Materiais e métodos, item 3.1.6.2). O lisado celular foi centrifugado e, o sobrenadante submetido a cromatografia de afinidade com níquel imobilizado. A eluição das proteínas retidas foi feita com um gradiente de imidazol. As frações coletadas na cromatografia, bem como amostras da fração insolúvel, do lisado celular e da cultura de células após a indução foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 22).



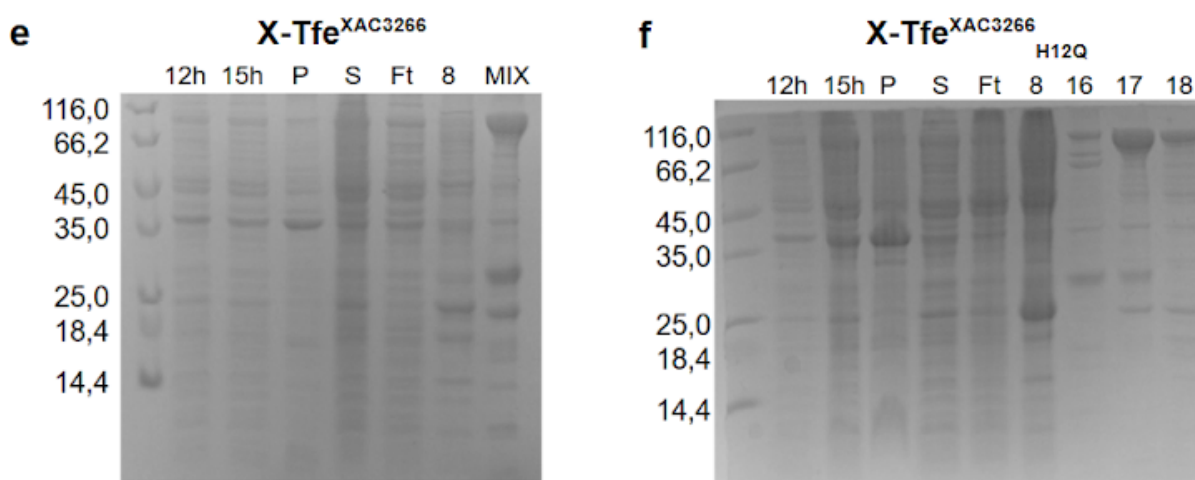


Figura 22: Purificação de X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} por cromatografia de afinidade. **(a)** e **(b)**: Gráficos de perfil de eluição em cromatografia de afinidade com gradiente de imidazol em coluna *Hitráp Chelating HP* de 5mL, com Ni²⁺ imobilizado (*GE Healthcare*). Foi usado o tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 % (v/v) de glicerol e gradiente de imidazol 5-300 mM. **(a)** Perfil de eluição de X-Tfe^{XAC3266} **(b)** Perfil de eluição de X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}. **(c)** zoom nas frações de eluição da proteína de interesse em **(a)**. **(d)** zoom nas frações de eluição da proteína de interesse em **(b)**. **(e)** e **(f)** SDS-PAGE Tris-tricina da indução, lise e cromatografia de afinidade de *E. coli* BL21(DE3)pLysS com pET28a-XAC3266 e pET28a-XAC3266-H12Q, induzidas em meio autoindutor ZYP-5052. 12h: Amostra coletada após 12 horas de cultivo em meio autoindutor; 15h: amostra coletada após 15 horas de cultivo em meio autoindutor. P: fração insolúvel da cultura induzida; S: fração solúvel da cultura induzida. Ft: fração inicial da lavagem da coluna. 8, 16, 17 e 18: frações coletadas durante a eluição; mix: mistura das frações 16,17 e 18.

As purificações das proteínas X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} apresentaram um pico que mostra a eluição de proteína que havia ficado retida na coluna. Quando se olha as bandas referentes às induções das duas proteínas nos géis de poliacrilamida, é possível ver uma banda correspondente ao peso molecular teórico das proteínas (94kDa). Uma vez que o valor de absorbância detectado durante a purificação de X-Tfe^{XAC3266} foi pequeno, as frações 16, 17 e 18 foram misturadas para aumentar a quantidade de proteína. A faixa referente a mistura (mix) possui uma banda saliente na região correspondente à massa teórica do efetor (94kDa). Como o gráfico de purificação de X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} apresentou dois picos sobrepostos na eluição das frações 16, 17 e 18, foi feita a eletroforese de cada amostra separada. As 3 amostras apresentaram bandas correspondentes à massa de 94

kDa, que corresponde ao efector mutante, sendo que a maior banda se encontrou na fração 17.

Também foi feita a expressão heteróloga do domínio AHH de X-Tfe^{XAC3266} (resíduos 1-127, peso molecular teórico 14 kDa) juntamente com o inibidor X-Tff^{XAC3267} (peso molecular teórico 26 kDa). A expressão foi feita utilizando o plasmídeo pET28a-XAC3267-AHH (a cauda de poli-histidina se localiza no N-terminal de X-Tff^{XAC3267}), cedido por Gabriel Oka (não publicado). Como o domínio tóxico é expresso junto com o inibidor, não há necessidade de usar meio autoindutor. A expressão foi feita em uma cepa *E. coli* BL21(DE3)RIL, em meio 2xTY como descrito, em detalhes, no item 3.1.4.

As células da cultura induzida foram lisadas com prensa *French*, e o sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi separado por centrifugação. O sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade com gradiente de imidazol em uma coluna carregada com Ni²⁺. Foi usado um tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM de imidazol e 2 % (v/v) de glicerol e para eluição das proteínas que ficaram aderidas à coluna, foi aplicado um gradiente de imidazol de 20 a 500 mM. Foram coletadas alíquotas das frações eluídas da cromatografia, bem como das etapas anteriores (indução e lise), para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida. O cromatograma e o gel de SDS-PAGE se encontram na Figura 23.

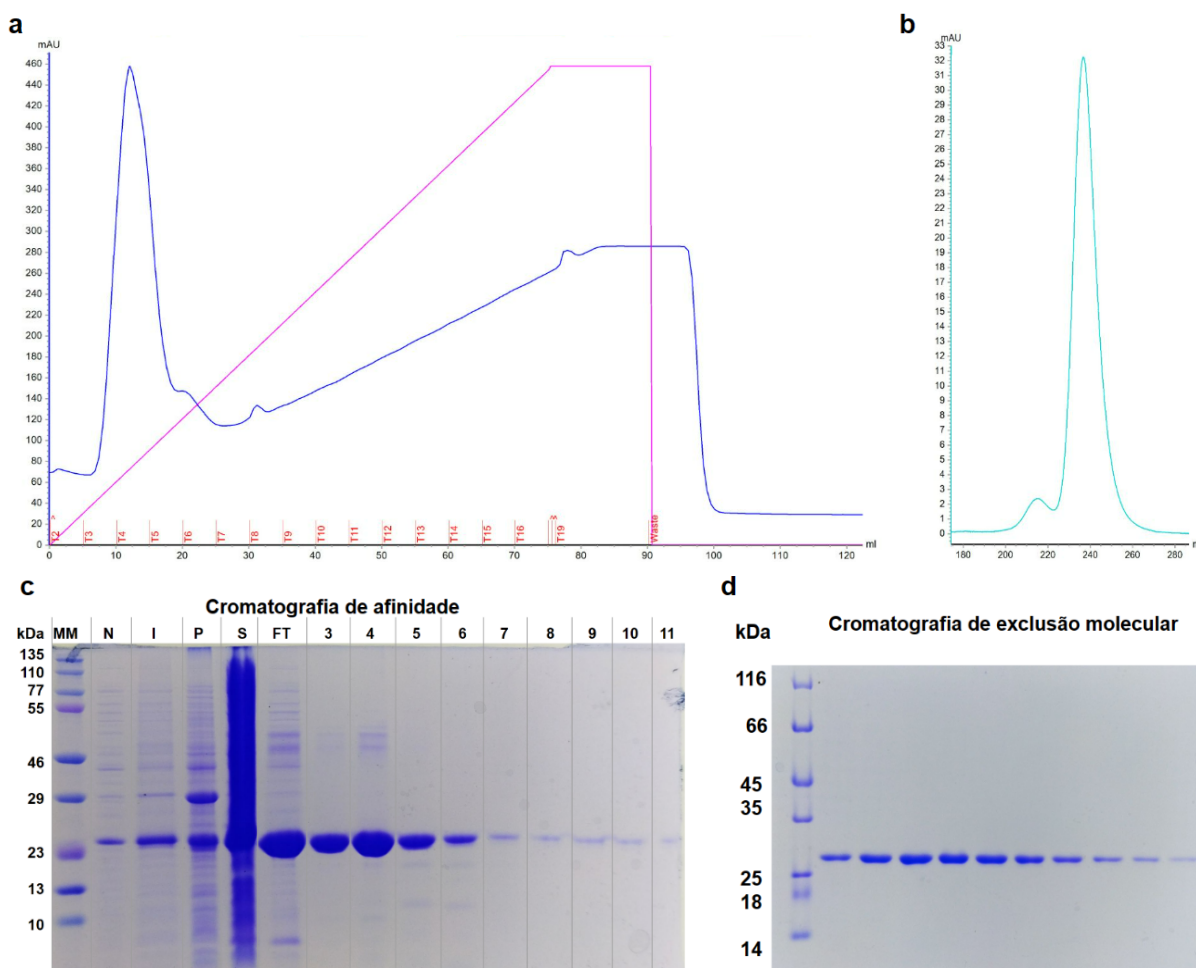


Figura 23: Purificação de $Tfi^{XAC3267}$. O lisado celular de *E. coli* BL21(DE3)RIL, expressando heterologamente $Tfi^{XAC3267}+X-Tfe^{XAC3266}_{1-126}$ em vetor pET28a, foi submetido a cromatografia de afinidade. As frações eluídas foram dialisadas em tampão de trombina (20 mM Tris pH 8,0, 20 mM NaCl, glicerol 1%), e submetidas à clivagem com trombina imobilizada em resina. Após a remoção da resina, o produto da reação de clivagem foi submetido a uma nova cromatografia de afinidade. A fração não retida na coluna foi coletada e concentrada utilizando filtro de centrifugação Amicon. O concentrado foi, por fim, submetido à cromatografia de exclusão molecular **(a)** Gráficos de perfil de eluição em cromatografia de afinidade do lisado. A eluição foi realizada com gradiente de imidazol em coluna *Hitrap Chelating HP* de 5mL, com Ni^{2+} imobilizado (*GE Healthcare*). Foi usado o tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 % (v/v) de glicerol e gradiente de imidazol 20-500 mM. **(b)** Gráfico do perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular de $Tfi^{XAC3267}$. Foi usada uma coluna Superdex S200 (*GE Healthcare*) acoplada ao equipamento ÄKTA Pure (*GE Healthcare*) e o tampão 10 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM NaCl e 2% de glicerol **(c)** SDS-PAGE da expressão, lise e frações da cromatografia de afinidade de $Tfi^{XAC3267}+X-Tfe^{XAC3266}_{1-126}$. **(d)** SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular de $Tfi^{XAC3267}$.

A massa molecular teórica da proteína $X-Tfi^{XAC3267}$, calculada pela ferramenta *ProtParam* do portal *ExPASy*, é de 24 kDa. É possível ver a banda referente à massa da proteína, de forma distinta, em todas as amostras. A proteína aparece inclusive

na cultura não induzida, mas em menor quantidade que na induzida, por conta de uma expressão basal da proteína. A faixa correspondente às frações iniciais do processo de lavagem da coluna apresenta uma banda substancial condizente com massa molecular teórica da proteína. A presença dessa banda deve-se, provavelmente, à saturação da coluna por conta da grande quantidade da proteína X-Tff^{XAC3267}.

Quanto ao domínio AHH, não é possível visualizar bandas destacadas referentes à massa molecular do domínio (14 kDa). A ausência de uma banda proporcional à banda de X-Tff^{XAC3267}, sugere que ou do domínio pode ter sido expresso em pequena quantidade (talvez devido à toxicidade), ou a interação entre o domínio AHH e o inibidor pode ter sido comprometida pela ausência de outras regiões do efector, fora do domínio tóxico.

As frações que, no gel de poliacrilamida, apresentaram as bandas mais proeminentes 3, 4 e 5 foram misturadas e o imidazol retirado por diálise para permitir a clivagem da cauda poli-histidina por trombina. A amostra foi submetida a clivagem por trombina imobilizada em resina, como descrito no item 3.1.8. Após esse período, a resina com trombina foi separada por centrifugação. A amostra foi, então, submetida a uma nova cromatografia de afinidade com o objetivo de eliminar contaminantes que pudessem ter sido eluídos com a proteína. Nessa segunda etapa de cromatografia de afinidade a proteína sem cauda de poli-histidina atravessa a coluna sem interagir, e os contaminantes que interagem com níquel ficam retidos.

A amostra resultante das etapas de purificação por cromatografia de afinidade foram concentradas com auxílio de um filtro de centrifugação amicon, e submetidas à cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex S200. Para essa eluição foi usado uma solução tampão de 10 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM NaCl e 2%

de glicerol. O gráfico da eluição dessa etapa de cromatografia, bem como o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida de cada fração eluída que apresentou um pico durante a cromatografia se encontram na Figura 23.

4.5.2. Determinação do estado oligomérico das proteínas

O estado oligomérico das proteínas estudadas foi determinado por espalhamento de luz multiângulo acoplado a cromatografia de exclusão molecular (SEC-MALS). Os cromatogramas obtidos bem como os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida das frações coletadas ao final do processo podem ser visualizados na Figura 24.

É possível ver que as frações correspondentes aos picos do cromatograma correspondem à massa esperada de cada proteína (X-Tfe^{XAC3266}: 94 kDa, X-Tfi^{XAC3267}: 24 kDa, X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}: 94 kDa e o complexo X-Tfi^{XAC3267}/X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}: 118 kDa). Também é possível ver que, quando fazemos a gel-filtração do complexo entre X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} com X-Tfi^{XAC3267} (Figura 24), as proteínas coeluem e a banda de ambas pode ser detectada no gel. Isto indica que X-Tfi^{XAC3267} interage com X-Tfe^{XAC3266} com força suficiente para que as proteínas permaneçam ligadas durante o processo de cromatografia.

Além disso, as medições feitas por espalhamento de luz mostram que os picos que saem da coluna de cromatografia possuem massa muito próxima de suas respectivas massas teóricas, como mostrado na Figura 24. Ou seja, todas as proteínas (efetor, efetor mutante, e inibidor) eluem como monômeros. Também é possível ver que X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} e X-Tfi^{XAC3267} se ligam em uma estequiometria de uma molécula de inibidor para cada molécula de efetor, uma vez que a massa que

eluída da cromatografia da mistura é 120 kDa, que corresponde a soma da massa das duas proteínas. No gráfico, a diferença no volume de eluição de X-Tfe^{XAC3266} e X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} foi devido a um atraso ao se iniciar a medição do espalhamento de X-Tfe^{XAC3266} durante a cromatografia.

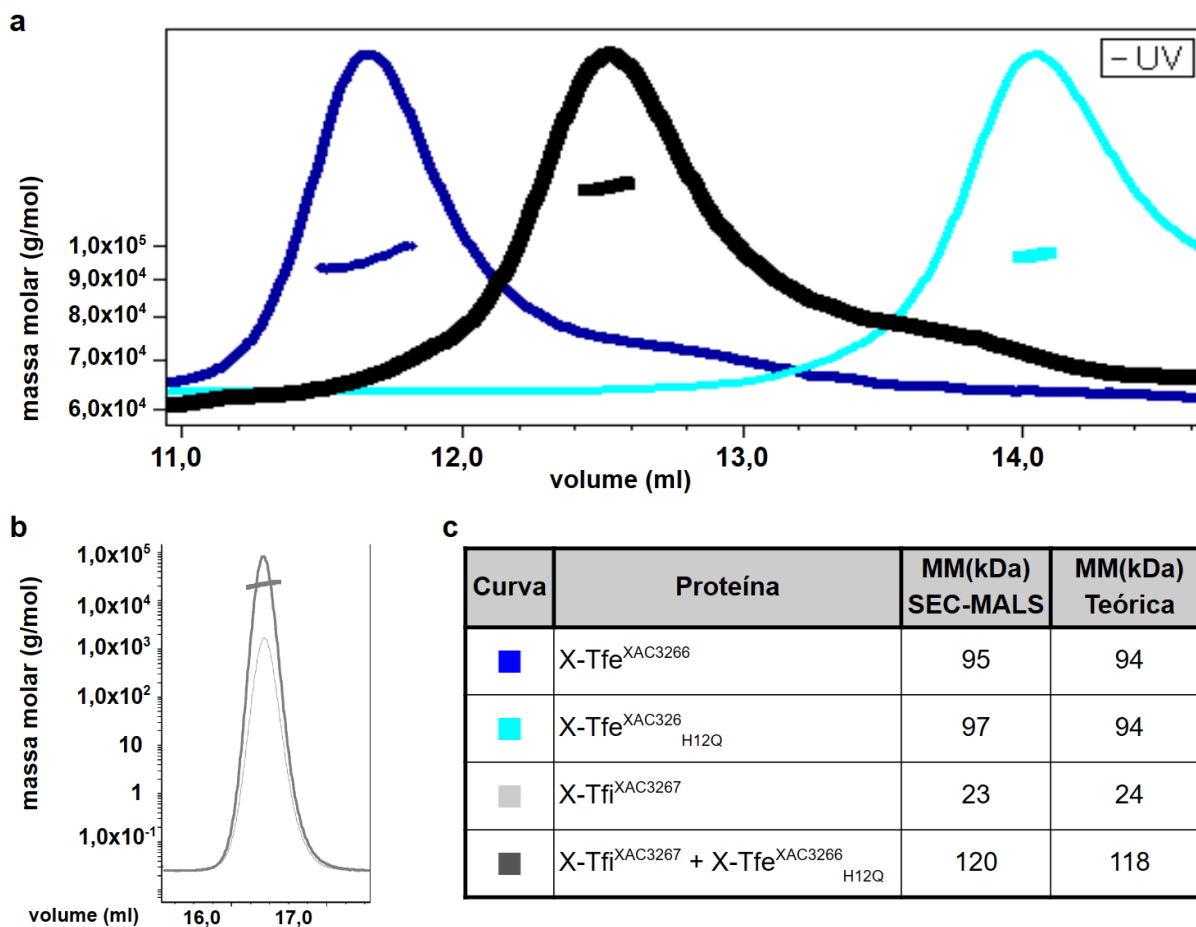


Figura 24: Análises de SEC-MALS de X-Tfe^{XAC3266}, X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} e X-Tfi^{XAC3267}. O ensaio foi realizado com uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) e usou o tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, 5% de glicerol. **(a)** e **(b)** Gráficos de SEC-MALS das proteínas estudadas. As curvas representam a absorbância a 280 nm por volume eluído, as linhas que atravessam o pico representam a distribuição de massa molar calculada na região do pico de absorbância. X-Tfe^{XAC3266}, X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} e mistura equimolar de X-Tfi^{XAC3267} X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}. **(a)** Curvas referentes a eluição de X-Tfe^{XAC3266} (azul) X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} (ciano) e mistura equimolar de X-Tfi^{XAC3267} X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} (preto) **(b)** Curva referente a eluição de X-Tfi^{XAC3267} (cinza). **(c)** Tabela com valores de massa molar experimentais (obtidos por SEC-MALS) e teóricos (calculados pela ferramenta *ProtParam* do portal *Expasy*).

4.5.3. ***X-Tfe^{XAC3266} é capaz de degradar DNA plasmidial in vitro***

Com o objetivo de avaliar a possível atividade DNase de X-Tfe^{XAC3266} e sua inibição por X-Tfi^{XAC3267}, procurou-se realizar ensaios enzimáticos de degradação de DNA plasmidial *in vitro*. As proteínas X-Tfe^{XAC3266}, X-Tfe^{XAC3266_{H12Q}} e X-Tfi^{XAC3267} purificadas como descrito nos itens 2.3 e 3.3.1, foram utilizadas para os ensaios enzimáticos. Foi usado como substrato o plasmídeo pNPTS138a (5360 kb) linearizado. O plasmídeo foi clivado com *XhoI* gerando um fragmento linear de 5360 kb, e também foi realizada a clivagem com *XhoI* e *BamHI*, gerando dois fragmentos, um com 3000 kb e outro com 2300 kb. O tampão reacional consiste de 10 mM de TrisHCl (pH 7,6), 50 mM de NaCl e 2 mM de DTT. Como essa família de nucleases frequentemente utiliza como cofator cátions divalentes (ZHANG; IYER; ARAVIND, 2011), os ensaios foram realizados avaliando o efeito da presença de íons Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, bem como o efeito da adição do sequestrante de íons metálicos EDTA. As reações foram realizadas em tubos de PCR de 200 µl a 30°C por 2 horas. Após esse período, os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para visualização dos plasmídeos.

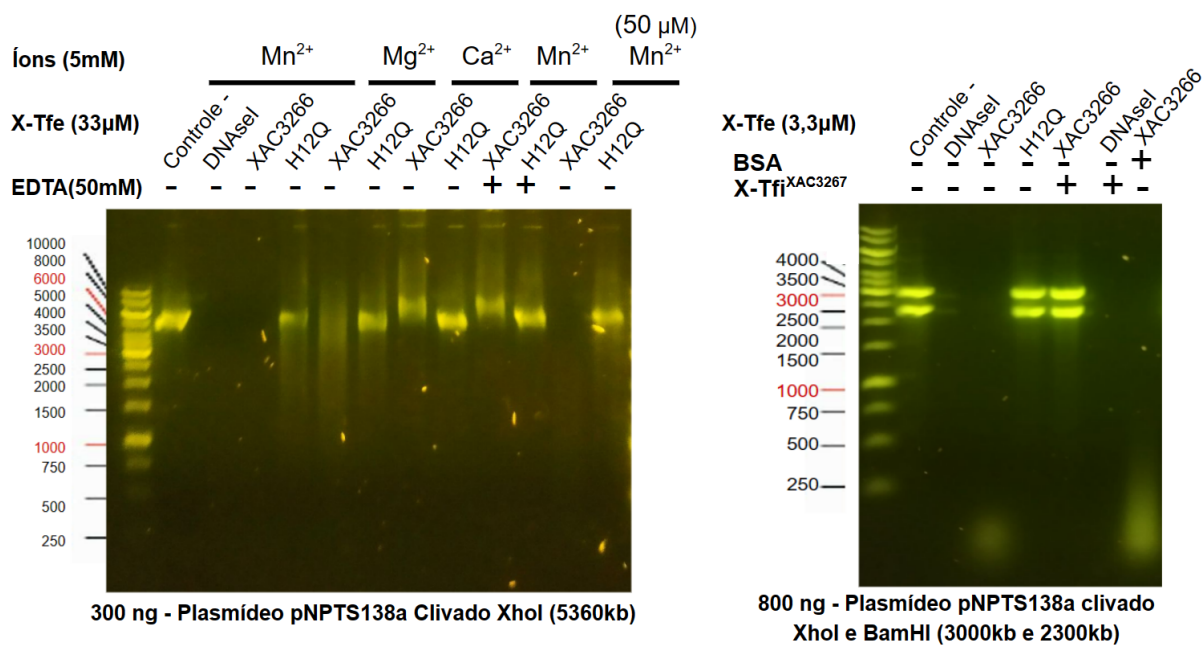


Figura 25: Atividade DNase, in vitro, de X-Tfe^{XAC3266}. As reações foram realizadas em meio com tampão 10 mM de Tris pH7,6; 50 mM de NaCl e 2 mM de (DTT). As reações foram realizadas por 2 horas a 30°C. Como substrato foi utilizado o plasmídeo pNPTS138a. Na figura, são mostrados os resultados de eletroforese em gel de agarose 1% das reações. As condições de cada reação estão indicadas na figura.

Pela observação das bandas referentes ao plasmídeo nos géis, pode-se observar que X-Tfe^{XAC3266} degradou completamente o DNA na presença de Mn²⁺, parcialmente na presença de Mg²⁺ e não degradou na presença de Ca²⁺. Também não degradou na presença de Mn²⁺ quando se adiciona EDTA. Nas condições nas quais o efetor selvagem estava presente e não degradou do plasmídeo (presença de Ca²⁺ e Mn²⁺ com EDTA) é possível notar um pequeno deslocamento da banda do plasmídeo em direção a região de maior massa molecular, isso pode indicar que na ausência de um íon que propicie a reação, a proteína tipo selvagem se liga ao DNA sem degradá-lo. Essa ligação adicionaria um massa extra ao DNA que acabaria aparentando ter um tamanho maior. Enquanto isso, o mutante, X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} não foi capaz de degradar DNA em nenhuma das condições.

Inicialmente foi utilizada uma concentração de 5 mM dos cátions bivalentes. Uma vez que a presença do manganês resultou numa degradação de DNA mais

completa, foram feitas reações com uma concentração 100 vezes menor do íon (50 μM) e 10 vezes menor do efetor (3,3 μM). Nessa condições, também verificou-se que a presença de X-Tfi^{XAC3267} aboliu a atividade do efetor, mas não do controle com DNaseI. Enquanto a adição da mesma concentração molar de albumina de soro bovino (BSA) não inibiu a ação de X-Tfe^{XAC3266}. Desta forma, podemos concluir que X-Tfi^{XAC3267} inibe a atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266} de forma específica.

4.6. X-Tfe^{XAC3266} é transportado para o citosol da célula receptora

O efetor X-Tfe^{XAC3266} possui uma longa região central (resíduos 92-734; Figura 7a), localizada entre o domínio XVIPCD (responsável pelo reconhecimento por VirD4 para transporte pelo X-T4SS) e o domínio nuclease AHH (ALEGRIA et al., 2005). Especulou-se que essa região central pode estar relacionada ao transporte do efetor do periplasma da célula alvo para o citoplasma da mesma, uma vez que essa nuclease é o único efetor do X-T4SS de *X. citri* cuja ação tóxica dependeria da presença da proteína no citoplasma, e não no periplasma.

Com o objetivo de investigar se X-Tfe^{XAC3266} possui capacidade de translocação através da membrana interna da célula alvo, foi proposto o uso de um ensaio de translocação com Cre recombinase ou *CRAFT* (VERGUNST et al., 2000). Esse ensaio tem sido usado com sucesso para averiguar a translocação de substratos de outros T4SS entre bactérias usando chimeras de efetores com recombinase Cre. A transferência dessas chimeras para o citoplasma da célula alvo é detectada pelos efeitos de recombinação de sequências específicas chamadas *loxP* da recipiente ao remover um trecho de DNA que impede a expressão de um gene repórter (LANG et al., 2010; TROKTER; WAKSMAN, 2018).

Para esse ensaio, foi desenhada uma quimera proteica formada pela junção da recombinase Cre do fago P1 com uma construção de X-Tfe^{XAC326} deficiente do domínio nuclease AHH (X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁). Essa construção, na qual a região C-terminal da proteína Cre é fusionada à região N-terminal X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁, foi clonada em um vetor pBRA (entre os sítios de clivagem de *Xho*I e *Sal*I; vide Figura 9a) para utilização em ensaios de translocação.

Primeiramente, procurou-se verificar se a quimera Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹ conserva a atividade recombinase da proteína Cre. Isto foi feito avaliando os eventos de recombinação induzidos pela expressão heteróloga de Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹ na cepa *E. coli* CSH26Cm::LTL (LANG et al., 2010), que possui um sistema repórter ativado pela ação da recombinase Cre. Esta cepa contém um gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol interrompido por um gene de resistência à canamicina flanqueado por sequências *loxP*. A recombinação promovida pela proteína com domínio Cre remove o gene de resistência a canamicina, restabelecendo a integridade do gene de resistência a cloranfenicol. Desta forma, a bactéria resistente a canamicina e sensível a cloranfenicol se torna, sob ação de Cre, resistente a cloranfenicol e sensível a canamicina.

Células competentes de *E. coli* CSH26Cm::LTL foram transformadas por choque térmico com cloreto de cálcio com os plasmídeos pXAC-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹, pBRA-Cre ou pBRA (vazio). Após o choque térmico, as células foram recuperadas com adição de 1ml de meio 2XTY com 0,1% de arabinose e deixadas a 37°C por 1 hora. Após esse período, as culturas foram concentradas a um volume de 200 µL e plaqueadas em duas placas de petri com meio 2xTY sólido. Uma placa contendo espectinomicina 100 µg/ml, para selecionar as transformantes e outra contendo cloranfenicol 25 mg/ml, para selecionar as recombinantes. As placas foram

incubadas durante a noite a 37°C. Por fim, o número de colônias foi contado e a razão entre colônias recombinantes e transformantes foi calculada para cada cultura (Figura 26).

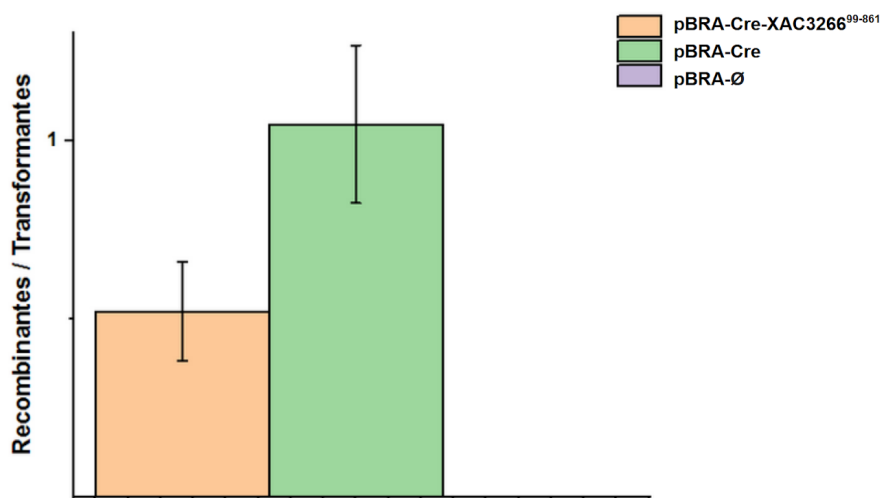


Figura 26: Eficiência de recombinação da quimera Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹. Cepas de *E. coli* CSH26Cm::LTL foram transformadas com plasmídeos pBRA-∅, pBR-Cre e pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹, pela técnica de choque térmico. Após a aplicação do choque térmico, foi adicionado 1 ml de meio 2xTY com 0,1% de arabinose para induzir a expressão das proteínas e promover recombinação. As culturas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Em seguida as cepas foram concentradas, por centrifugação, para um volume de 200 µl. Essa suspensão de células foi plaqueada em duas placas com meio 2xTY com 1,5% de ágar, uma com espectinomicina a 100 µg/ml, para seleção das células transformantes, e outra com cloranfenicol 25 µg/ml, para a seleção das células recombinantes. A eficiência de recombinação foi determinada pela razão entre cepas recombinantes (resistentes a cloranfenicol) e transformantes (resistentes a espectinomicina). Cada barra representa a eficiência de recombinação de uma construção. Salmão: quimera Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹; verde: proteína Cre; roxo: vetor vazio (controle).

A quimera Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹ conservou a atividade no domínio recombinase. A média da razão entre o número de células que sofreram recombinação nos sítios loxP e número de células que foram transformadas com pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹, com sucesso, foi cerca de 50%. Enquanto isso, as cepas que expressaram a proteína Cre apresentaram 100% de eventos de recombinação, ou seja, todas as células que foram transformadas com o plasmídeo pBRA-Cre sofreram eventos de recombinação. A cepa expressando o vetor pBRA vazio não apresentou nenhum

evento de recombinação, como esperado. Com isso, é possível afirmar que os plasmídeos pBRA-Cre e pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹ codificam um domínio Cre funcional e podem ser utilizados para o ensaio CRAFT.

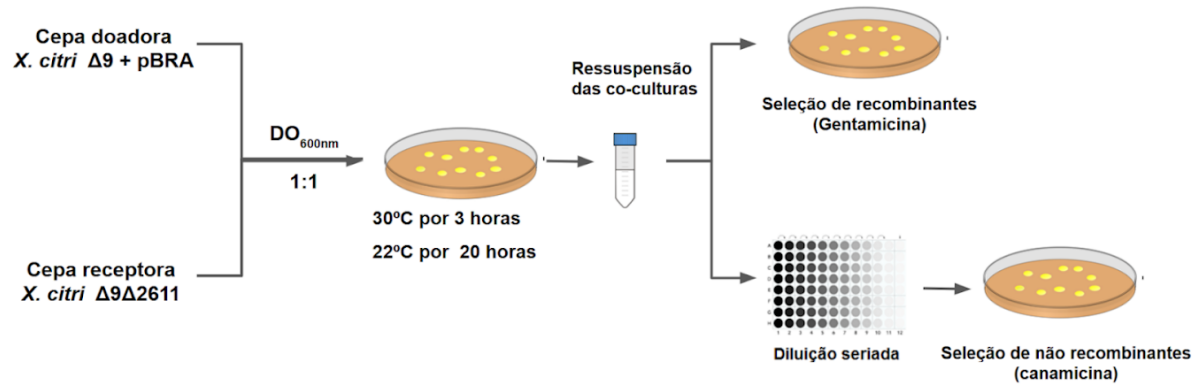
O ensaio de translocação com Cre recombinase é realizado de forma similar a um ensaio de competição bacteriana, na qual uma cepa doadora e uma receptora são co-cultivadas e, após esse tempo de contato, as cepas células são ressuspendidas e plaqueadas em meio seletivo para posterior contagem de CFUs, buscando observar um efeito sobre as células receptoras. No caso do experimento CRAFT, diferentes culturas de células de *X. citri* $\Delta 9$ doadoras (com plasmídeos pBRA-Cre-XAC3266⁹⁹⁻⁸⁶¹, ou pBRA-Cre, ou pBRA- \emptyset) são co-cultivadas com células receptoras de *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ contendo um plasmídeo repórter, uma vez que é esta cepa é suscetível ao ataque do X-T4SS. O plasmídeo repórter utilizado foi o pCM100, que possui sequências loxP, suscetíveis à ação da recombinase Cre. O plasmídeo possui, flanqueado por sítios *LoxP*, um gene para resistência à canamicina e um terminador. Esse conjunto é seguido por um gene para resistência a gentamicina. Desta forma, o plasmídeo naturalmente confere resistência a canamicina à bactéria. Sob ação da recombinase, o gene de resistência a canamicina e o terminador são removidos, tornando a bactéria resistente à gentamicina, e sensível à canamicina.

As cepas foram cultivadas como descrito no item 3.4.3. As células, após lavadas e misturadas em proporções iguais (DO_{600nm} igual a 1), foram depositadas (sem espalhamento) em volume de 5 μ l em 3 diferentes placas. Duas placas contendo meio 2xTY, 1,5% de ágar e 100 μ g/ml de ampicilina, e uma placa com meio 2xTY 20%, 1,5% de agarose e 100 μ g/ml de ampicilina. As placas com ágar foram incubadas a 30°C, uma pelo período 3 horas e outra 20 horas. Enquanto a

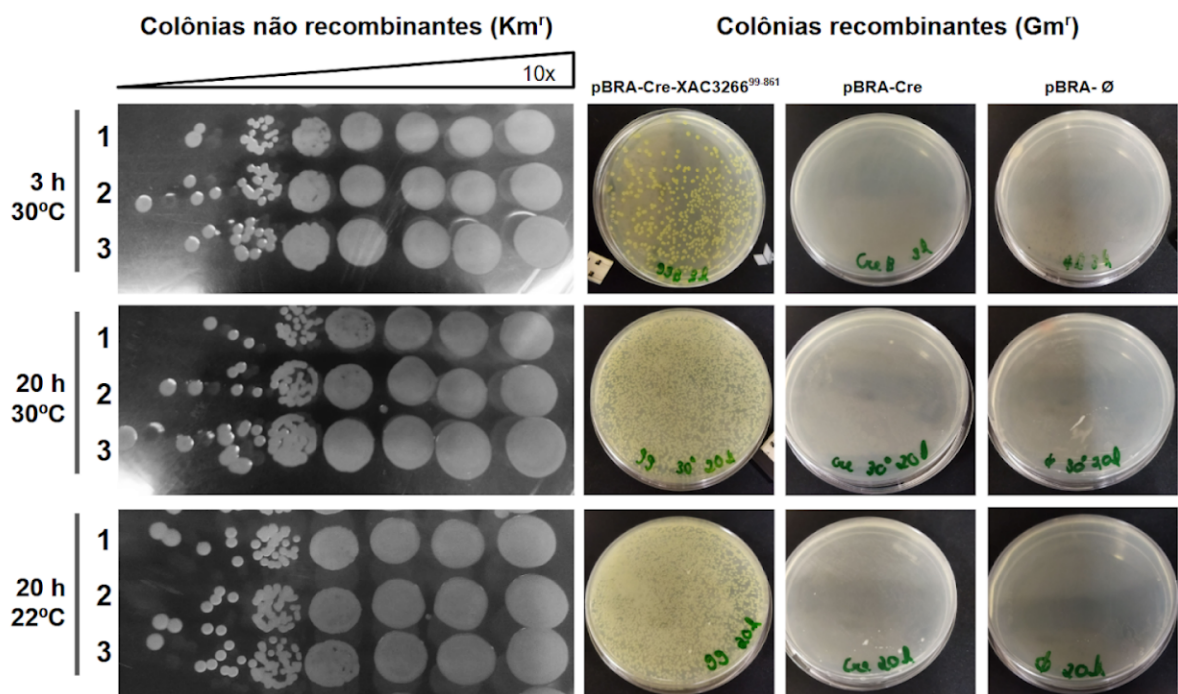
placa com agarose foi incubada a 22°C por 20 horas. Após o tempo de incubação, as células foram ressuspensas em 1 ml de solução salina (NaCl 0,9%). As culturas foram concentradas por centrifugação para um volume de 200 µl, dos quais metade foi plaqueada em placas com meio 2xTY com 100 µg/ml ampicilina e 20 µg/ml de gentamicina, para seleção das células recombinantes. Os 100 µl restantes foram submetidos a uma diluição seriada (10x de passo) e a diluição foi pipetada em uma placa com ampicilina e canamicina para seleção de bactérias não recombinantes. A Figura 27b mostra as colônias recombinantes para cada cepa testada.

Foi possível observar que a cepa de *X. citri* Δ9 que expressa a quimera Cre-X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁ foi capaz de induzir eventos de recombinação nas culturas da cepa com plasmídeo repórter (*X. citri* Δ9Δ2611+pCM100). Já a cepa que expressa apenas a proteína Cre (com plasmídeo pBRA-Cre) não foi capaz de provocar recombinação nas células alvo, assim como o controle negativo com o vetor vazio (pBRA-Ø). Isso mostra que a proteína Cre-X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁ foi capaz de atingir o citosol da célula receptora de forma independente do domínio nuclease AHH. A diferença entre meio mais e menos concentrados não foi perceptível, ao contrário do que ocorre nos ensaios de competição bacteriana, nos quais o meio e a temperatura são cruciais para que seja possível observar o efeito da ação nuclease do domínio AHH de X-Tfe^{XAC3266}. A diferença entre o número de recombinantes nos tempos de 3 horas e 20 horas, possivelmente, não se deve a um número diferente de recombinações. Embora seja possível que eventos de recombinação aconteçam ao longo do tempo, é mais provável que o número superior de células recombinantes seja devido à duplicação das células recombinantes durante o tempo maior de experimento.

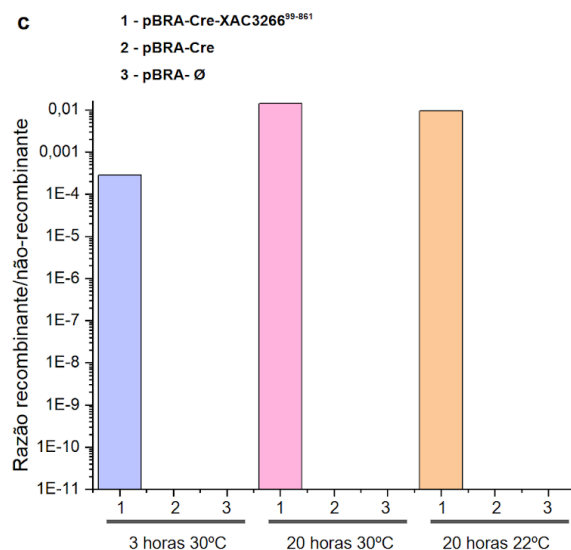
a



b



c



d

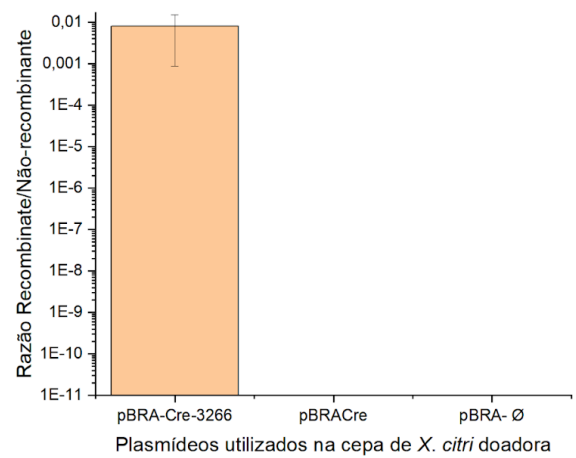


Figura 27: Ensaio de translocação com recombinase Cre. **(a)** Representação esquemática das principais etapas do ensaio CRAFT **(b)** Representação esquemática das etapas do ensaio CRAFT. **(c)** CFU de XAC Δ 9 Δ 2611+pCM100 em ensaios de 3 e 20 horas a 30°C; e de 20 horas a 22°C. A imagem da direita mostra as colônias recuperadas após a diluição seriada (10x de passo) de bactérias não recombinantes, que são resistentes à canamicina (Km^r). A imagem da esquerda mostra as colônias recombinantes, que são resistentes a gentamicina (Gm^r). **(d)** Gráfico da razão CFU recombinante/não recombinante em cada experimento **(e)** Média das razões CFU recombinante/não recombinante nos três experimentos.

5. Discussão

Grande esforço é despendido na compreensão da biologia de microrganismos patogênicos, sejam patógenos de interesse para a saúde humana, ou de saúde de animais e plantas de interesse humano. Entretanto, a maior parte desse esforço costuma ser destinado a compreensão da interação desses microrganismos com o hospedeiro. Entretanto, é preciso considerar que esses organismos, em muitos casos, interagem com microrganismos de outra espécie. Por isso, entender como *X. citri*, que interage com outras bactérias competidoras, pode ajudar a encontrar estratégias para controlar esse importante fitopatógeno.

5.1. X-Tfe^{XAC3266} é um efector bactericida do X-T4SS

Embora fosse conhecido que o X-T4SS de *X. citri* é uma arma empregada para matar bactérias Gram-negativas competidoras, não havia evidências que efector X-Tfe^{XAC3266} tivesse alguma contribuição na função do sistema de secreção de *X. citri*.

Contudo, curvas de crescimento de *E. coli* expressando ectopicamente o efector X-Tfe^{XAC3266} mostraram que a proteína exerce um potente efeito tóxico que impede o crescimento da bactéria, e que esse efeito não era provocado pelo efector com a mutação (X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q}) em resíduo provável sítio catalítico da proteína (Figuras 15 e 16). Também foi mostrado que quando o inibidor putativo de X-Tff^{XAC3267} era expresso com o efector, a bactéria apresentava um crescimento normal (Figura 15).

Assim sendo, X-Tfe^{XAC3266} apresentava um forte efeito deletério quando expresso em *E. coli*, mas esse efeito não se verifica em ensaios de competição

contra essa bactéria. Uma das possíveis explicações é a questão de dosagem: quando expressa ectopicamente, todas as células de *E. coli* expressam o efector e a quantidade produzida pode ser grande demais para que os mecanismos de reparo de DNA de *E. coli* consiga evitar a morte da célula. Por outro lado, em ensaios de competição, o número de moléculas do efector transferidas provavelmente é muito menor. É possível que, nessas condições, os mecanismos de reparo de DNA de *E. coli* consigam contornar os efeitos deletérios da atividade de X-Tfe^{XAC3266}. Experimentos futuros usando cepas de *E. coli* deficientes em mecanismos de reparo de DNA podem testar esta hipótese.

Uma outra hipótese levantada era que X-Tfe^{XAC3266} poderia ser mais efetiva em competições contra bactérias taxonomicamente afins. Uma vez que essas bactérias têm uma chance maior de disputar o mesmo nicho, possuir algum mecanismos de ataque contra bactérias “primas” pode conferir uma vantagem adaptativa. Esse fenômeno é bem documentado no caso de colicinas, toxinas que possuem domínios com atividade nuclease e matam apenas bactérias taxonomicamente afins (SHARP et al., 2017).

Partindo dessa hipótese, foram realizados ensaios de competição entre diferentes cepas de *X. citri*. Entretanto, *X. citri* possui um gene (*xac2611*) cujo produto atua como um inibidor geral do sistema, protegendo contra ataques de células irmãs (Gabriel Oka e Shaker Chuck Farah; dados não publicados). Por isso, foi utilizada uma cepa mutante *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$, produzida por Gabriel Oka (não publicado) que, além de não possuir nenhum par efector inibidor do T4SS de *X. citri*, também tem deletado o gene do inibidor geral do sistema, XAC2611.

Nas competições entre as cepas de *X. citri* foi observado, por microscopia, uma forte efeito tóxico provocado por X-Tfe^{XAC3266} contra a célula alvo, com inibição

da duplicação celular quando em contato com a célula atacante (Figura 19). A princípio, esse efeito não foi observado em ensaios de competição bacteriana. Nesses dois experimentos, as células são preparadas da mesma forma, sendo a única diferença entre as competições as condições do meio. Os ensaios de competição são feitos com meio 2xTY com 1,5% de ágar e o experimento se processa a 30°C. Por outro lado, as condições das competições realizadas em lâminas de microscopia utilizam meio mais diluído (20% de 2xTY) e agarose ao invés de ágar, esse meio é mais transparente e permite uma melhor visualização das células. Além disso, a microscopia é realizada em temperatura ambiente.

Os experimentos de competição com contagem de CFU foram, então, repetidos usando as condições utilizadas para os ensaios de microscopia, com o meio diluído, agarose ao invés de ágar e temperatura de 22°C (item 3.4). A diferença entre a razão do número de colônias alvos e atacantes recuperadas da competição na qual a cepa atacante era *X. citri* $\Delta 8$ foi milhares de vezes menor que da na competição que a cepa atacante era *X. citri* $\Delta 9$, mostrando que X-Tfe^{XAC3266} produz um grande efeito nas competições contra uma bactéria alvo (Figura 19). Além disso, o fato do mutante *X. citri* $\Delta virB7$ ter um resultado semelhante a cepa sem efetores mostra que a função de X-Tfe^{XAC3266} em competição é dependente de um X-T4SS funcional. Também é importante ressaltar que o efeito gerado por X-Tfe^{XAC3266} desaparece quando a cepa alvo *X. citri* $\Delta 9\Delta 2611$ é complementada com o gene que codifica o inibidor cognato do efetor, X-Tfi^{XAC3267} (Figura 19). O conjunto desses resultados de experimentos de competição atestam que X-Tfe^{XAC3266} é um efetor do X-T4SS e que X-Tfi^{XAC3267} é seu inibidor cognato.

As razões da diferença observada nas duas condições diferentes de competição ainda não foram investigadas experimentalmente. Elas podem ser

devido a diferença na velocidade de crescimento das bactérias nos dois experimentos (30°C vs 22°C). Com a temperatura mais baixa e o meio de cultura com menos nutrientes, o crescimento bacteriano é reduzido. Isso pode permitir que o efeito tóxico do efector não seja percebido devido ao crescimento das células alvo. Uma maior taxa de crescimento também pode aumentar as chances que uma célula seja rapidamente cercada por células irmãs da mesma cepa antes de ficar em contato com células da outra cepa. Também é possível que os efetores do X-T4SS forneçam uma vantagem competitiva dependente do estado de crescimento da célula alvo. Esse efeito foi observado no efector Tde de *A. tumefaciens* com atividade DNase (YU et al., 2021).

Foi observado em ensaios de competição interbacteriana que Tde DNase possuía a capacidade de matar bactérias competidoras quando o experimento era realizado em meio pobre em carbono. Quando as competições são realizadas em meio rico em nutrientes a vantagem competitiva fornecida pelo efector desaparece. Esses resultados levaram os autores a propor a hipótese de que os diferentes efetores do T6SS de *A. tumefaciens* poderiam permitir que a bactéria consiga competir com outros organismos em diferentes condições de crescimento da célula-alvo (YU et al., 2021). Considerando que o X-T4SS possui pelo menos 8 efetores e que apenas um deles já é suficiente para matar células alvo (BAYER-SANTOS et al., 2019; OKA et al., 2022), seria interessante investigar se os diferentes efetores de do X-T4SS possuem dominância diferente em diferentes condições de crescimento.

5.2. A atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266}

Como já discutido no item 1.4, existem poucos dados experimentais sobre a atividade nuclease de proteínas com domínio AHH. Já havia sido demonstrado que a proteína V2a de *Agrobacterium tumefaciens*, quando é expressa de forma heteróloga em *E. coli*, é capaz de degradar (*in vivo*) o próprio plasmídeo que a codifica (SANTOS et al., 2020). Também foi demonstrado que o lisado celular de *E. coli* expressando heterologamente a região C-terminal de Rhs2 de *A. baumannii* é capaz de degradar DNA genômico de *A. baylyi* e que mutações em duas histidinas conservadas do predito sítio catalítico abolem a atividade nuclease do efetor.

Neste estudo, a caracterização da atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266} foi abordada sob vários ângulos. Foi mostrado que a expressão heteróloga do efetor ativou a resposta SOS de reparo de DNA em *E. coli* (Figura 20). Para isso, foi usada uma cepa de *E. coli* com plasmídeo pSC101-PrecA::GFP (RONEN et al., 2002), que codifica o gene de GFP sob controle de um promotor de genes relacionados a cascata do sistema SOS de degradação, que codifica o GFP sob controle do promotor recA. Esta cepa emite fluorescência quando a resposta SOS é ativada, funcionando como um repórter para dano ao DNA (item 3.6). De forma semelhante, a expressão heteróloga de X-Tfe^{XAC3266} foi capaz de degradar plasmídeos *in vivo* (Figura 21). Ambos os efeitos demonstrados pela expressão do efetor não foram vistos em cepas que expressavam a mutação H12Q. Além disso, a presença do inibidor, aboliu o efeito tóxico do efetor nestes experimentos (Figura 21).

A atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266} também foi demonstrada por experimentos de degradação de plasmídeos *in vitro* (item 3,9). Os ensaios de atividade enzimática mostraram que o efetor não apresentou atividade nuclease na

presença de íons Ca^{2+} . Porém, foi verificada atividade na presença dos íons Mn^{2+} e Mg^{2+} , sendo que atividade nuclease foi maior na presença do íon Mn^{2+} . Na presença de EDTA, nenhuma atividade foi observada (Figura 25), confirmando as previsões da literatura de que os domínios AHH dependem de cátions divalentes para sua atividade DNase (ZHANG et al., 2012). É interessante notar também, que nas reações que avaliaram a atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266}, quando na presença de íons Ca^{2+} ou EDTA, observamos um pequeno deslocamento (*shift*) nas bandas do gel referentes aos plasmídeos. (Figura 25). É possível hipotetizar que esse efeito se deva à interação entre X-Tfe^{XAC3266} e o DNA plasmidial. É possível supor que a proteína se liga ao DNA, mas na ausência do cátion divalente adequado, não é capaz de degradá-lo. Futuros experimentos podem confirmar essa hipótese.

De forma semelhante ao observado nos experimentos *in vivo*, o mutante X-Tfe^{XAC3266}_{H12Q} não foi capaz de degradar DNA plasmidial *in vitro*. O inibidor X-Tfi^{XAC3267} foi capaz de inibir a atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266} e não teve efeito sobre a atividade da DNase I, que foi utilizada como controle. Além disso, a atividade de X-Tfe^{XAC3266} não foi prejudicada pela presença de BSA. Isso demonstra que a inibição da atividade nuclease de X-Tfe^{XAC3266} produzida por X-Tfi^{XAC3267} é específica para esse par efetor/inibidor.

5.3. Atuação de X-Tfe^{XAC3266} no citosol de bactérias alvo/recipientes.

Como apresentado no item 1.3, todos os efetores do X-T4SS de *X. citri*, com exceção de X-Tfe^{XAC3266}, possuem domínios cuja atividade é esperada no periplasma. Além disso, os inibidores (X-Tfi) cognatos a esses X-Tfes, possuem um peptídeo sinal de lipoproteínas e um lipobox (Figura 5c), indicando que essas

proteínas se localizam no periplasma e se ancoram na membrana da célula, protegendo a própria *X. citri* da ação tóxica da X-Tfe periplasmática correspondente.

O mesmo não se aplica a X-Tfe^{XAC3266}. Seu inibidor X-Tfi^{XAC3276} não possui peptídeo sinal de lipoproteínas nem um lipobox. Além disso, os experimentos apresentados neste estudo mostram que X-Tfe^{XAC3266} é um efetor do X-T4SS de *X. citri* (Figura 19) e que possui atividade nuclease (Figuras 20, 21 e 25). Assim, podemos inferir que X-Tfe^{XAC3266} alcança o citosol da célula alvo. E levando em conta que a cepa de atacante *X. citri* $\Delta 8$ não tem outros efetores secretados por esse sistema, a vantagem conferida por X-Tfe^{XAC3266} em competição bacteriana a essa cepa não depende do dano causado a bactéria alvo por outros efetores do X-T4SS.

Visto que X-Tfe^{XAC3266} possui uma longa região central (resíduos 92-734; Figura 7) entre o domínio nuclease AHH e domínio XVIPCD, especulou-se que essa região pode estar relacionada ao transporte do efetor do periplasma da célula alvo para o citoplasma da mesma. Para testar essa hipótese foi realizado um ensaio de translocação com recombinase Cre (VERGUNST et al., 2000) conforme descrito nos itens 3.5 e 4.6. Foi desenhada uma proteína quimera formada pela junção da recombinase Cre fusionada a uma construção do efetor que não contém os aminoácidos 1 a 98 (Cre-X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁), ou seja, sem o domínio tóxico AHH.

Os ensaios demonstraram que a quimera Cre-X-Tfe^{XAC3266}₉₉₋₈₆₁ apresentou atividade no citosol da célula alvo, promovendo recombinação nos sítios *loxP* do plasmídeo repórter. Foi demonstrado, assim, que o domínio nuclease AHH não é necessário para que o efetor alcance o citosol da célula alvo.

Analisando a sequência de X-Tfe^{XAC3266}, é possível ver que a proteína tem na região central, entre os domínios AHH e XVIPCD, vários motivos zíper de glicina Figura 28a. Fazendo buscas utilizando a sequência de aminoácidos da região

central de X-Tfe^{XAC3266} (92 a 734) com a ferramenta JACKHMMER (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011), foi possível avaliar proteínas com sequência de aminoácidos similares. A busca foi feita no banco de dados Uniprot. Após 3 rodadas de iterações foram encontradas 104 proteínas que apresentam sequências com correspondência significativa. Analisando o logotipo de sequências dessas proteínas é possível observar uma região rica em glicínias conservadas (Figura 28b).

Entre as proteínas que apresentam correspondência com a região central de X-Tfe^{XAC3266}, encontramos proteínas com domínio Zeta-toxina, cuja atividade UDP-N-acetilglucosamina quinase inibe a fase citosólica da biossíntese da parede celular, podendo atuar como um bactericida (MUTSCHLER et al., 2011). A arquitetura dessas proteínas consiste em um domínio zeta-toxina seguido por uma longa região central (sem domínio identificado) com sequência correspondente à região central de X-Tfe^{XAC3266} seguida por um domínio C-terminal conservado, de função desconhecida (Figura 28c). Uma das sequências com domínio Zeta toxina encontradas corresponde a um efetor de um X-T4SS de *Lysobacter antibioticus* 76, homólogo ao X-T4SS de *X. citri*, que, presumivelmente, precisa ser transportado através da membrana interna de bactérias alvo .

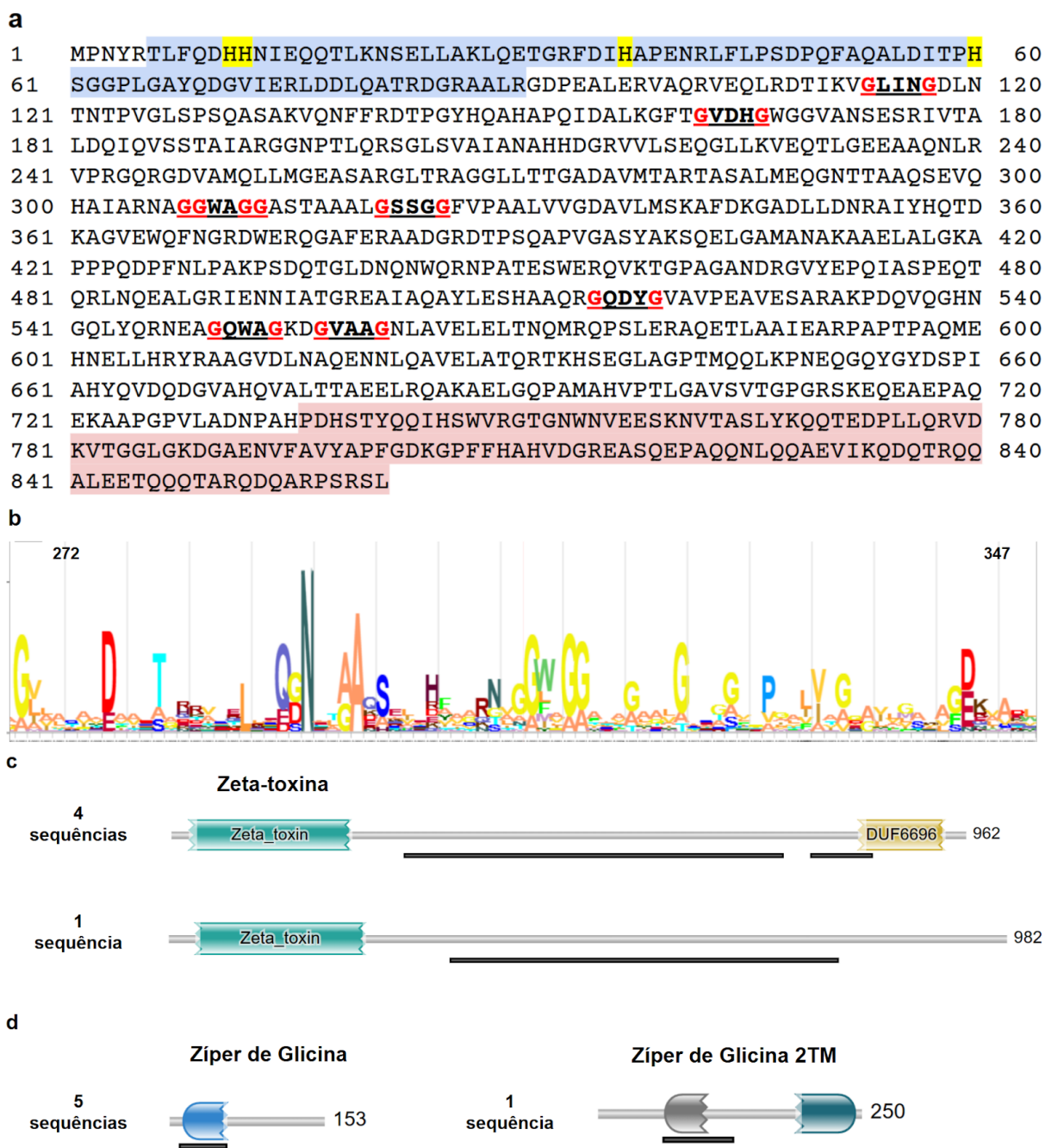


Figura 28: Análise da sequência de aminoácidos da região central de X-Tfe^{XAC3266}. **(a)** Análise dos motivos GxxxG associado à zíper de glicínias presentes na sequência de X-Tfe^{XAC3266}. Os potenciais motivos zíper de glicina aparecem em negrito e sublinhados, com as glicínias realçadas em vermelho; domínio AHH (1-90) em azul com suas histidinas conservadas em amarelo; domínio XVIPCD (729-861) em vermelho. **(b)**, **(c)** e **(d)** Análises realizadas a partir de buscas por proteínas com similaridade de sequências com a região central (92-734) de X-Tfe^{XAC3266}. Foram feitas 3 iterações usando a ferramenta JACKHMMER (Finn et al. 2011). Logotipo de sequência obtido a partir do alinhamento de sequência de proteínas com correspondência de aminoácidos da região central (92-734) de X-Tfe^{XAC3266}. A altura do empilhamento indica a conservação da sequência em cada posição, enquanto a altura do símbolo indica a frequência relativa de cada aminoácido na posição. Arquitetura de proteínas com domínio Zeta toxina. **(d)** motivos da superfamília zíper de glicina, e da família 2TM de zíper de glicina. As sequências alvo correspondentes foram agrupadas com base nos domínios Pfam encontrados em toda a sequência. As regiões que

correspondem à região central de X-Tfe^{XAC3266} são indicadas pelas faixas pretas sob o gráfico de sequência. Os resultados são apresentados de acordo com o que é visualizado diretamente no endereço eletrônico da ferramenta.

Outra correspondência que se destacou na análise foi de proteínas com domínios Zíper de glicina (Figura 28c). Esta superfamília caracteriza-se por ter motivos característicos GxxxGxxxG, muitas vezes com várias cópias em sequência (KIM et al., 2005). Foram encontradas 6 proteínas com esses motivos com correspondência em sequências da região central de X-Tfe^{XAC3266}, sendo 1 deles da família 2TM (Figura 28d), que é caracterizada por duas alfa-hélices transmembranares contendo zíperes de glicina (ANDERSON; BAUMSTARK; BELLINI, 1988).

Já foi citado que efetor Tde1, com atividade nuclease, de *Agrobacterium tumefaciens*, possui na região N-terminal, cópias contínuas de motivos GxxxG semelhantes à estrutura de zíper de glicina (ALI et al., 2023). Foi demonstrado que os motivos GxxxG governam a entrega de Tde1 no citosol de bactérias Gram-negativas competidoras ao permeabilizar a membrana citoplasmática da célula alvo.

Futuros estudos poderão investigar se o motivo rico em glicinas presente na região central do efetor X-Tfe^{XAC3266} é responsável pelo transporte através da membrana interna da célula alvo. E poderão investigar qual mecanismo rege esse processo. E mesmo antes disso, o fato de que a região central de X-Tfe^{XAC3266} é responsável pelo transporte do efetor através da membrana interna da célula alvo abre a possibilidade de utilizar essa sequência proteica em outros experimentos para avaliar a função de translocação do X-T4SS em *X. citri* e outros Xanthomonadales, bem como o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas.

6. Conclusão

O campo de estudo das interações microbianas é muito vasto, e estamos apenas começando a entender as dinâmicas que regem a coexistência desses organismos tão versáteis. Muito se tem avançado no entendimento de microrganismos patogênicos, especialmente bactérias. No entanto, é preciso expandir o campo de estudo de patógenos para além da sua interação com o hospedeiro, principalmente quando tratamos de fitopatógenos. Bactérias que infectam plantas precisam percorrer um longo caminho até conseguirem colonizar o hospedeiro. Entender como essas bactérias disputam espaço umas com as outras e quais mecanismos desenvolveram para atacar e resistir a competidores pode abrir caminhos para o controle de doenças e desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas.

Nesse estudo avançamos na compreensão do sistema de secreção do Tipo IV bactericida presente na ordem *Xanthomonadales*. Estudando o efector X-Tfe^{XAC3266} do X-T4SS de *X. citri*, um importante fitopatógeno que ataca culturas de citrus, pudemos demonstrar que a proteína é um efector desse sistema de secreção, e que possui atividade nuclease proveniente de um domínio AHH. Foi mostrado que X-Tfe^{XAC3266} exerce uma atividade antibacteriana, conferindo vantagem competitiva à *X. citri* através de um potente efeito tóxico. Efeito esse, que foi demonstrado através de competições bacterianas, ensaios de microscopia e experimentos de expressão heteróloga do efector. Também foi possível caracterizar a atividade enzimática do efector. Através de ensaios de degradação de plasmídeos e de ativação de sistema de reparo de DNA foi demonstrado que X-Tfe^{XAC3266} é uma nuclease. E o uso de plasmídeos que codificam o efector com mutação em um resíduo conservado do sítio

catalítico confirmou que se trata de uma nuclease da família AHH. Além disso, foi demonstrado que a região central de X-Tfe^{XAC3266} consegue acessar o citosol da célula alvo independentemente da presença do domínio tóxico.

Em conjunto, os resultados fornecem contribuições para a compreensão sobre como bactérias competem, como funcionam efetores antibacterianos e abre caminho para novos estudos sobre translocação de efetores através da membrana citoplasmática. Também fornece uma ferramenta para estudos de secreção, uma vez que os ensaios utilizando construções de X-Tfe^{XAC3266} fusionados a recombinase Cre (ou outras proteínas repórter) podem servir para investigar os mecanismos de funcionamento do X-T4SS encontrado no genoma de *Xanthomonales*.

7. Referências bibliográficas

- ALEGRIA, M. C. et al. Identification of New Protein-Protein Interactions Involving the Products of the Chromosome- and Plasmid-Encoded Type IV Secretion Loci of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2315–2325, abr. 2005.
- ALI, J. et al. A glycine zipper motif is required for the translocation of a T6SS toxic effector into target cells. **EMBO reports**, v. n/a, n. n/a, p. e56849, 17 abr. 2023.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E. et al. Secrete or perish: The role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 279–302, 24 dez. 2020.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; CHRISTIE, P. J. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 73, n. 4, p. 775–808, dez. 2009.
- AN, S.-Q. et al. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, p. 1–32, 1 jan. 2020.
- ANDERSON, B. E.; BAUMSTARK, B. R.; BELLINI, W. J. Expression of the gene encoding the 17-kilodalton antigen from *Rickettsia rickettsii*: transcription and posttranslational modification. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 10, p. 4493–4500, out. 1988.
- Bacterial Transformation and Competent Cells—A Brief Introduction - BR.**
Disponível em:
<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>>. Acesso em: 9 fev. 2023.
- BASLER, M.; MEKALANOS, J. J. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6096, p. 815, 17 ago. 2012.
- BAYER-SANTOS, E. et al. The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 9, p. e1007651, 12 set. 2019.
- BELLIENY-RABELO, D. et al. Transcriptome and Comparative Genomics Analyses Reveal New Functional Insights on Key Determinants of Pathogenesis and Interbacterial Competition in *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 2, p. e02050-18, 9 jan. 2019.
- BENZ, J.; MEINHART, A. Antibacterial effector/immunity systems: it's just the tip of the iceberg. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, p. 1–10, fev. 2014.

BLATTNER, F. R. et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453–1462, 5 set. 1997.

BOCIAN-OSTRZYCKA, K. M. et al. Bacterial thiol oxidoreductases — from basic research to new antibacterial strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 10, p. 3977–3989, 2017.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 21, DE 25 DE ABRIL DE 2018. . 25 abr. 2018, Sec. 1, p. 91.

BUENO, N. F. Caracterização de dois pares efetor/inibidor associados ao Sistema de Secreção Tipo IV de. **São Paulo**, 2018.

CARSTENS, C.-P. et al. BL21-CodonPlus™ Cells Correct Expression Problems Caused by Codon Bias. [s.d.].

CHAGNOT, C. et al. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 303, 14 out. 2013.

CHANDRAN DARBARI, V.; WAKSMAN, G. Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 603–629, 2 jun. 2015.

CHERRAK, Y. et al. Structure and Activity of the Type VI Secretion System. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, p. 7.4.11, 12 jul. 2019.

CHRISTIE, P. J. The Rich Tapestry of Bacterial Protein Translocation Systems. **The protein journal**, v. 38, n. 4, p. 389–408, ago. 2019.

COSTA, T. R. D. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 343–359, jun. 2015.

DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459–463, maio 2002.

DAVANLOO, P. et al. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 7, p. 2035–2039, abr. 1984.

DEN DULK-RAS, A.; VERGUNST, A. C.; HOOYKAAS, P. J. J. Cre Reporter Assay for Translocation (CRAFT): A Tool for the Study of Protein Translocation into Host Cells. Em: VERGUNST, A. C.; O'CALLAGHAN, D. (Eds.). **Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2014. p. 103–121.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence

similarity searching. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Web Server issue, p. W29–W37, 1 jul. 2011.

FITZSIMONS, T. C. et al. Identification of Novel *Acinetobacter baumannii* Type VI Secretion System Antibacterial Effector and Immunity Pairs. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, p. e00297-18, 23 jul. 2018.

FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 6, p. 253, 1 ago. 2007.

GALÁN, J. E.; WAKSMAN, G. Protein Injection Machines in Bacteria. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1306–1318, 8 mar. 2018.

GIBSON, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343–345, maio 2009.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, v. 3, n. 1, p. 15, jan. 2002.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems – An overview. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 1, p. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012–2015, fev. 2016.

GROSSMAN, A. S. et al. A Widespread Bacterial Secretion System with Diverse Substrates. **mBio**, v. 12, n. 4, p. e01956-21, 17 ago. 2021.

HANAHAH, D.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R. [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Em: **Methods in Enzymology**. Bacterial Genetic Systems. [s.l.] Academic Press, 1991. v. 204p. 63–113.

HARMS, A. et al. A bacterial toxin-antitoxin module is the origin of inter-bacterial and inter-kingdom effectors of Bartonella. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 10, p. e1007077, 26 out. 2017.

HE, J. et al. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 8, p. 2530–2535, 24 fev. 2004.

HE, Y.-W.; CAO, X.-Q.; POPLAWSKY, A. R. Chemical Structure, Biological Roles, Biosynthesis and Regulation of the Yellow Xanthomonadin Pigments in the Phytopathogenic Genus *Xanthomonas*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 33, n. 5, p. 705–714, maio 2020.

JANA, B.; SALOMON, D.; BOSIS, E. A novel class of polymorphic toxins in *Bacteroidetes*. **Life Science Alliance**, v. 3, n. 4, p. e201900631, abr. 2020.

JURÉNAS, D.; JOURNET, L. Activity, delivery, and diversity of Type VI secretion

effectors. **Molecular Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 383–394, 2021.

KIM, S. et al. Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 40, p. 14278–14283, 4 out. 2005.

KLEIN, T. A.; AHMAD, S.; WHITNEY, J. C. Contact-Dependent Interbacterial Antagonism Mediated by Protein Secretion Machines. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 387–400, maio 2020.

KRATOCHWIL, C. F.; RIJLI, F. M. The Cre/Lox System to Assess the Development of the Mouse Brain. Em: SPRECHER, S. G. (Ed.). **Brain Development: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2020. p. 491–512.

LACOURSE, K. D. et al. Conditional toxicity and synergy drive diversity among antibacterial effectors. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 440–446, 19 fev. 2018.

LANG, S. et al. Molecular recognition determinants for type IV secretion of diverse families of conjugative relaxases: Type IV recognition signals for relaxase secretion. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1539–1555, dez. 2010.

MARUTHAMUTHU, M. KANNAN et al. Development of *recA* promoter based bisphenol-A sensing and adsorption system by recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 122, p. 31–37, jun. 2017.

MUTSCHLER, H. et al. A Novel Mechanism of Programmed Cell Death in Bacteria by Toxin–Antitoxin Systems Corrupts Peptidoglycan Synthesis. **PLoS Biology**, v. 9, n. 3, p. e1001033, 22 mar. 2011.

OKA, G. U. et al. Structural basis for effector recognition by an antibacterial type IV secretion system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 1, p. e2112529119, 5 jan. 2022.

OSHIRO, E. E. et al. Site-directed gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 1, p. 171–179, 1 abr. 2006.

PALMER, T. et al. A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. **Molecular Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 345–355, 2021.

QUENTIN, D. et al. Mechanism of loading and translocation of type VI secretion system effector Tse6. **Nature microbiology**, v. 3, n. 10, p. 1142–1152, out. 2018.

RONEN, M. et al. Assigning numbers to the arrows: Parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10555–10560, 6 ago. 2002.

SANCHES, A. L. R. et al. Análise econômica da prevenção e controle do cancro

cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 3, p. 549–566, set. 2014.

SANTOS, M. N. M. et al. Redundancy and Specificity of Type VI Secretion vgrG Loci in Antibacterial Activity of *Agrobacterium tumefaciens* 1D1609 Strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3004, 14 jan. 2020.

SELWOOD, T. et al. Advancement of the 5-Amino-1-(Carbamoylmethyl)-1H-1,2,3-Triazole-4-Carboxamide Scaffold to Disarm the Bacterial SOS Response. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2961, 18 dez. 2018.

SGRO, G. G. et al. Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1078, 21 maio 2019.

SHAHBAZ, E. et al. Citrus Canker Pathogen, Its Mechanism of Infection, Eradication, and Impacts. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 123, 26 dez. 2022.

SHARP, C. et al. Diversity and distribution of nuclease bacteriocins in bacterial genomes revealed using Hidden Markov Models. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 7, p. e1005652, 17 jul. 2017.

SOUZA, D. P. et al. A Component of the *Xanthomonadaceae* Type IV Secretion System Combines a VirB7 Motif with a N0 Domain Found in Outer Membrane Transport Proteins. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002031, 12 maio 2011.

SOUZA, D. P. et al. Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6453, 6 mar. 2015.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, maio 2005.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 5 maio 1986.

TROKTER, M.; WAKSMAN, G. Translocation through the Conjugative Type IV Secretion System Requires Unfolding of Its Protein Substrate. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 6, p. e00615-17, 23 fev. 2018.

TYLEWICZ, U. 1 - How does pulsed electric field work? Em: BARBA, F. J.; PARNIAKOV, O.; WIKTOR, A. (Eds.). **Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable Food for Tomorrow**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 3–21.

UMREKAR, T. R. et al. CryoEM of bacterial secretion systems: A primer for microbiologists. **Molecular Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 366–382, 2021.

VERGUNST, A. C. et al. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5493, p. 979–982, 3 nov. 2000.

YOSHIDA, N.; SATO, M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 791–798, 1 jul. 2009.

YU, M. et al. *Agrobacterium tumefaciens* Deploys a Versatile Antibacterial Strategy To Increase Its Competitiveness. **Journal of Bacteriology**, v. 203, n. 3, p. e00490-20, 11 jan. 2021.

ZHANG, D. et al. Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. **Biology Direct**, v. 7, p. 18, 25 jun. 2012.

ZHANG, D.; IYER, L. M.; ARAVIND, L. A novel immunity system for bacterial nucleic acid degrading toxins and its recruitment in various eukaryotic and DNA viral systems. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 11, p. 4532–4552, 1 jun. 2011.