
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PAPEL DA PROTEÍNA ZapA NA DIVISÃO CELULAR E PATOGENICIDADE DE
Xanthomonas citri subsp. *citri*

PAULA MARIA MOREIRA MARTINS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Julho - 2013

PAULA MARIA MOREIRA MARTINS

**PAPÉL DA PROTEÍNA ZapA NA DIVISÃO CELULAR E PATOGENICIDADE
DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada)

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira
Co-orientador: Dr. Alexandre Morais do Amaral

Rio Claro
2013

576 Martins, Paula Maria Moreira
M386p Papel da proteína ZapA na divisão celular e
 patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Paula
 Maria Moreira Martins. - Rio Claro, 2013
 87 f. : il., figs., tabs., quadros

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Henrique Ferreira
 Coorientador: Dr. Alexandre Morais do Amaral

 1. Microorganismos. 2. Cancro cítrico. 3. Septo. 4.
 Bactéria. 5. Citricultura. 6. XAC3407. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

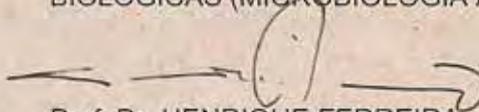
TÍTULO: Divisão celular e patogenicidade em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

AUTORA: PAULA MARIA MOREIRA MARTINS

ORIENTADOR: Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ALEXANDRE MORAIS DO AMARAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP - Araraquara



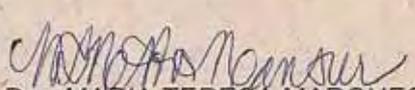
Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro



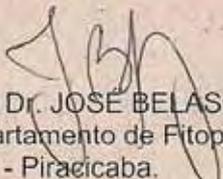
Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JÚNIOR

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro



Profa. Dra. MARIA TERESA MARQUES NOVO MANSUR

Departamento de Genética e Evolução - UFSCAR



Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR

Departamento de Fitopatologia e Nematologia - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP - Piracicaba.

Data da realização: 04 de julho de 2013.

Processo no. 547/2013

Interessado(a): Paula Maria Moreira Martins

Título da Tese: "Divisão celular e patogenicidade em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*"

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA

De acordo com o § 1º. do artigo 35 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), o(a) candidato(a) deverá enviar à Seção de Pós-Graduação, nove exemplares da tese, atendendo às sugestões e comentários propostos pela Comissão Examinadora.

() em exemplares impressos*

(X) em cópias digitais – arquivo em PDF, e um exemplar impresso para a Biblioteca*

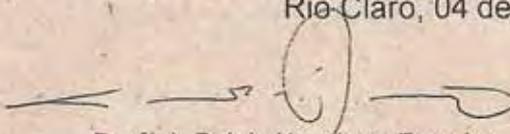
(X) alteração do título da tese

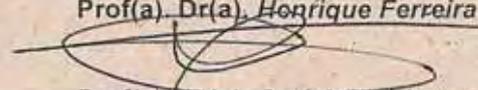
para: Papel da protease ZapA na divisão celular e patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

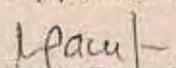
* Neste caso, ficam indicados os seguintes professores para verificação do atendimento:

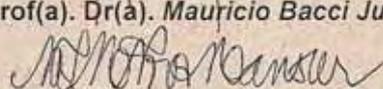
Henrique Ferreira

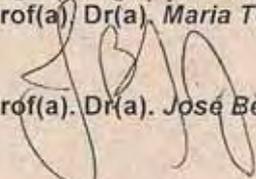
Rio-Claro, 04 de julho de 2013.


Prof(a). Dr(a). Henrique Ferreira


Prof(a). Dr(a). André Rodrigues


Prof(a). Dr(a). Mauricio Bacci Junior


Prof(a). Dr(a). Maria Teresa Marques Novo Mansur


Prof(a). Dr(a). José Belasque Júnior

Aos meus pais e noivo
por todo o suporte que recebi
ao longo destes anos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus professores por me mostrarem o caminho, e a Deus pela força na difícil tarefa de seguir em frente.

Aos meus pais pelo esforço, dedicação e carinho que sempre tiveram por mim e agradeço também ao meu noivo João, que sem dúvidas me tornou uma pessoa melhor. Obrigada por ser meu norte – e me tirar do laboratório de vez em quando.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na missão de encarar o fim de um doutorado no meio e do reinício de outro – com tão pouco tempo para o fim. Nada do que aprendi nestes (doloridos) anos está aqui nesta tese, mas está tudo em mim. Aprendi a deixar a bagagem leve – se pesa não me serve.

Ao prof. Henrique Ferreira pela orientação, paciência e confiança que depositou em mim nos últimos sete anos. Que esta seja só a primeira de muitas teses. Aos colegas de todos os laboratórios pelos quais passei durante minha pós graduação em Rio Claro, S.J.Rio Preto, Araraquara, Cordeirópolis, São Paulo e São Carlos. Não me atrevo a dizer nomes, pois não caberiam aqui, mas agradeço: Obrigada pela companhia!

Aos que me ajudaram diretamente neste trabalho, destaco o auxílio do Dr. Maxuel de Andrade e seu orientador, Prof. Dr. Shaker Chuck. Farah nos experimentos de duplo-híbrido e cessão da biblioteca de Xac. Também agradeço à Prof. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur por ceder seu laboratório e material para a realização dos experimentos de 2D e, pela inestimável ajuda, agradeço às suas alunas M.Sc Carolina Carnielli e M.Sc. Flavia Zandonadi, assim como à Dra. Ana Paula Felício durante o árduo processo de análise dos resultados da espectrometria de massas. Ao Dr. José Belasque Jr ao Fundecitrus por todo o suporte na casa de vegetação e ao prof. Dr. Maurício Bacci Jr. por nos ceder seu laboratório em muitos momentos ao longo de minha pós-graduação, que curiosamente começou e terminou em suas bancadas.

Ao PPG Microbiologia Aplicada e seu coordenador Fernando Carlos Pagnocca, por quem tenho especial carinho e gratidão. Obrigada pela

oportunidade de ingressar no doutorado neste local tão especial no qual iniciei meus estudos. Ao CNPq agradeço pela bolsa de doutorado concedida e a FAPESP pelo auxílio financeiro ao longo de todo o projeto.

Agradeço também (e por que não?) às minhas queridas bactérias. Que elas saibam que todo meu esforço nisto tudo é e sempre será pelo grande amor que sinto por esse mundinho. Há quase 20 anos descobri a microbiologia e desde então minha vida mudou para sempre. Obrigada bactérias!

O cientista navega entre dois pólos: o desejável e o possível. Sem possível, o desejável não passa de sonho. Sem desejável, o possível não passa de tédio. Muitas vezes é difícil resistir ao sonho e à utopia. Mas a experimentação permite conter a imaginação. A cada etapa o cientista é obrigado a expor-se à crítica e à experiência para limitar a participação do sonho na representação do mundo que elabora. *O procedimento científico consiste em confrontar sem cessar o que poderia ser e o que é.*

{Jacob, 1998 #1304}

*Experientia praestantior
arte*

Resumo

A citricultura é uma das atividades mais importantes do setor agrícola brasileiro. Ainda assim, a incidência de doenças como o cancro cítrico afeta sobremaneira a produtividade dos pomares. Seu agente etiológico, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é capaz de infectar todas as espécies cultivadas, não havendo cura para plantas afetadas. Assim, dados a respeito de seus processos biológicos básicos poderiam auxiliar a vislumbrar soluções para esta enfermidade. Assim, visamos com este trabalho obter informações sobre a formação do septo em Xac, processo do qual participa a proteína ZapA e cujas perturbações têm alto potencial de interferência na multiplicação da bactéria e, portanto, em seu controle.

Três estratégias foram utilizadas para esta determinação: 1) estudo de interactantes de ZapA através de ensaio de duplo-híbrido em leveduras; 2) análise do perfil de expressão global de um mutante produzindo cópias extras de ZapA, com a identificação de vias possivelmente por ela influenciadas; e 3) disrupção de ZapA e XAC3407, para averiguar sua interferência no estabelecimento de infecção *in planta*, sendo XAC3407 um possível novo componente septal a ser descrito em *Xanthomonas* spp.

Embora aparentemente os resultados não apontem para um envolvimento direto entre ZapA e a expressão do fenótipo virulento de Xac, os processos celulares nos quais esta proteína parece atuar diretamente são bastante variados, incluindo aqueles relativos à percepção de estresse, regulação da montagem do flagelo, citoesqueleto e biossíntese de componentes do envelope celular. Todos estes elementos são discutidos caso a caso neste trabalho, na tentativa de que possam lançar luz no conhecimento acerca da biologia básica de Xac.

Palavras-chave: divisão celular, septo, duplo-híbrido, gel bidimensional, XAC3407

Abstract

Citriculture is one of the most important activities of Brazilian agricultural sector. Even though, the incidence of diseases such as citrus canker affects drastically the orchards productivity. Its etiologic agent, the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) is able to infect all citric cultivars, without any treatment to the diseased plants until now. That's the reason why new data concerning the basic biological processes of Xac can be enormously useful to provide insight on its control.

What we sought with this work was to assess new information on Xac's septum formation, a process where the protein ZapA is involved and which impairment has a high potential for disturbing the bacterium growth and, consequently, be useful for control purposes.

Three approaches were used for us to reach these goals: 1) the study of ZapA interactants by an yeast-two-hybrid assay; 2) analysis of the expression profile of a mutant strain with extra copies of ZapA, allowing the identification of biochemical pathways possibly influenced by this protein; and 3) depletion of ZapA as well as of XAC3407, to assess its interference during infection establishment *in planta*, being XAC3407 a possible new septal component to be described in *Xanthomonas* spp.

Although our data seems not to support any involvement of ZapA in the virulent phenotype of Xac, the protein-protein interactions and pathways in which it is enrolled are as broad as stress perception, flagellum assembly regulation, cytoskeleton and cell envelope biosynthesis. All these elements are discussed in this work in the hope that it may shed light on the current knowledge of Xac's basic biology.

Keywords: cell division, septum, yeast-two-hybrid, bidimensional gel, XAC3407

SUMÁRIO

1	Introdução	11
1.1	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> e o cancro cítrico.....	11
1.2	Divisão celular bacteriana	14
1.2.1	Divisão celular em <i>Xanthomonas sp.</i>	19
2	Objetivos	21
2.1	Objetivos gerais	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	Capítulo I: Análise dos interactantes de ZapA de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>: Ensaio de duplo-híbrido em leveduras	22
3.1	Introdução.....	22
3.2	Material e Métodos.....	26
3.2.1	PCR e clonagem no vetor pOBD.....	26
3.2.2	Transformação de pOBD- <i>zapA</i> em levedura.....	26
3.2.3	Transformação contra a biblioteca de Xac e triagem para falso-positivos	27
3.2.4	Miniprep de leveduras	28
3.2.5	Transformação em <i>E.coli</i> KC8	29
3.2.6	Análise dos dados.....	30
3.3	Resultados e discussão	31
3.3.1	Síntese flagelar e reguladores: XAC1933 (FliA), XAC0424, XAC4154 (FliY) e XAC0610 (Histidina quinase – regulador de resposta).....	34
3.3.2	Interação com o ambiente e destoxificação: XAC2529 (RhsD), XAC1136 (PrpR) e XAC4352 (Gst)	39
3.3.3	Metabolismo de aminoácidos: XAC2985 (GabP), XAC1653 (SerS) e XAC0631 (PtrB)	42
3.3.4	Regulação bioquímica e estrutural: XAC0360 (GlpD), XAC0361 (GlpR), XAC1716 (PyrG), XAC1176 (SrfJ), XAC2273 (hipotética) e XAC2273 (hipotética)	44
4	Capítulo II: Análise global do perfil de expressão em Xac na presença de cópias extras de ZapA^{Xac}	48
4.3.1	XAC3579 – fosfoglucomutase (XanA).....	60
4.3.2	XAC3211 - Trealose sintase (OtsA)	61
4.3.3	XAC0541 Chaperona GroES	62
4.3.4	XAC3980 - Protease DO (HtrA).....	63
4.3.5	XAC1012 – outer membrane protein (MopB)	64
4.3.6	XAC1885 - Aconitato hidratase (Acn2).....	65
5	Capítulo III: Análise dos mutantes nocaute do gene ZapA^{Xac} e XAC3407	67
5.1	Introdução.....	67
5.2	Material e Métodos.....	68
5.2.1	PCR e clonagem dos fragmentos.....	68
5.2.2	Transformação de Xac	68
5.2.3	Teste de patogenicidade	69
5.3	Resultados e Discussão.....	70
6	Conclusões Gerais	72
	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o cancro cítrico

O cancro cítrico é uma doença que afeta todas as espécies de citros, acometendo-as em intensidade variável conforme a suscetibilidade de cada variedade. O primeiro registro que se tem desta enfermidade em pomares brasileiros data da década de 50, na cidade de Presidente Prudente, no interior do estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Desde então, o cancro cítrico tornou-se uma doença endêmica em algumas regiões do Brasil (COLETTA-FILHO et AL, 2011), fato este que, dada a importância da indústria da laranja, vem causando ao longo do tempo grandes perdas econômicas e de competitividade frente ao mercado internacional desta fruta.

Existem cinco tipos de cancrozes descritos até o momento, os quais são denominados “A”, “B”, “C”, “D” e “E”, todas elas com características epidemiológicas próprias em vários aspectos (SCHAAD et al, 2005). A mais importante de todas é a cancrose do tipo A (também conhecida como “asiática”), dado seu amplo espectro de penetração dentre os diversos cultivares e também por ser esta a cancrose que mais severamente afeta o hospedeiro.

O agente etiológico da cancrose do tipo A é a bactéria denominada *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al, 2006). Inicialmente englobada no gênero *Pseudomonas* após sua descoberta nos EUA (HASSE, 1915), este micro-organismo passou por algumas alterações de nomenclatura, tendo sido sequenciada sob o nome de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, nome ainda utilizado em diversas bases de dados e do qual decorre sua abreviatura mais comum, “Xac”.

As lesões induzidas por este patógeno são facilmente reconhecidas, afetando frutos, caules e folhas, preferencialmente em sua fase mais jovem. Elas se iniciam com a intumescência da região afetada, seguida pela formação dos cancroes propriamente ditos - decorrentes da hiperplasia do mesófilo foliar - os quais adquirem aparência corticosa e envolta por halos cloróticos com o passar do tempo (Figura 1).

Figura 1: A) Frutos e folhas apresentando sintomas do cancro cítrico (SCHUBERT, 2004). B) Detalhe das lesões corticosas e salientes em folhas infectadas (LOTZ, 2004)



Embora devastadora para seu hospedeiro, Xac possui baixa resistência às intempéries às quais é exposta no ambiente epifítico. Incapaz de sobreviver por longos períodos longe das lesões que provoca, esta bactéria é basicamente dispersa por eventos climáticos como chuvas, assim como pelo trânsito de pessoas e máquinas nos pomares, não havendo até hoje a determinação de qualquer vetor (como insetos) que atue no ciclo desta doença (GRAHAM et al, 2004).

As medidas aplicadas a pomares afetados baseiam-se na erradicação das plantas afetadas e aquelas à sua volta, já que não há formas de tratamento conhecidas para esta enfermidade. No Brasil, as políticas públicas de controle do cancro cítrico sofreram afrouxamento no ano de 2009, o que rapidamente resultou em significativo aumento nos casos de sua incidência no estado de São Paulo, saltando de 0,14% (2009) para 1,39% (2012) – um aumento de quase 900% em apenas três anos (FUNDECITRUS, 2012).

Desde a descoberta do agente etiológico do cancro cítrico (HASSE, 1915), quase cem anos já se passaram – mais de dez com o conhecimento de seu genoma completo (DA SILVA et al, 2002). Ainda assim, até hoje muito pouco se pode fazer para minimizar os impactos provocados por esta doença, restando ao produtor utilizar apenas medidas preventivas, havendo poucas alternativas senão a destruição de plantas e talhões inteiros quando os mesmos são acometidos. Faz-se necessário, portanto, que novos estudos sejam realizados, visualizando esta questão sob nova perspectiva, sendo o aprofundamento no conhecimento da

biologia básica deste microrganismo capaz de fornecer alvos preciosos para seu combate.

1.2 Divisão celular bacteriana

Mutantes de *Escherichia coli* que filamentavam ao serem submetidos a determinadas temperaturas foram descritos ainda na década de 60 (HIROTA, 1968 apud GUEIROS-FILHO, 2012), e seu potencial no estudo do processo de divisão celular logo foi percebido, iniciando uma longa fase de descobertas da genética de bactérias (BURDETT; MURRAY, 1974; WALKER et al., 1975). Rapidamente mutantes relacionados a processos básicos como divisão celular foram identificados, levando-nos ao conhecimento de genes hoje muito estudados, os quais são genericamente designados na série *fts* (de “filamentation temperature sensitive”): *ftsA*, *ftsQ*, *ftsW*, etc.

Desde sua descoberta (LUTKENHAUS et al., 1980), o envolvimento do produto do gene *ftsZ* nos processos básicos de septação tem sido amplamente estudado. O que era inicialmente apenas mais um dos genes capazes de induzir filamentação logo mostrou-se um dos fatores essenciais para o processo de divisão em bactérias (DAI; LUTKENHAUS, 1991).

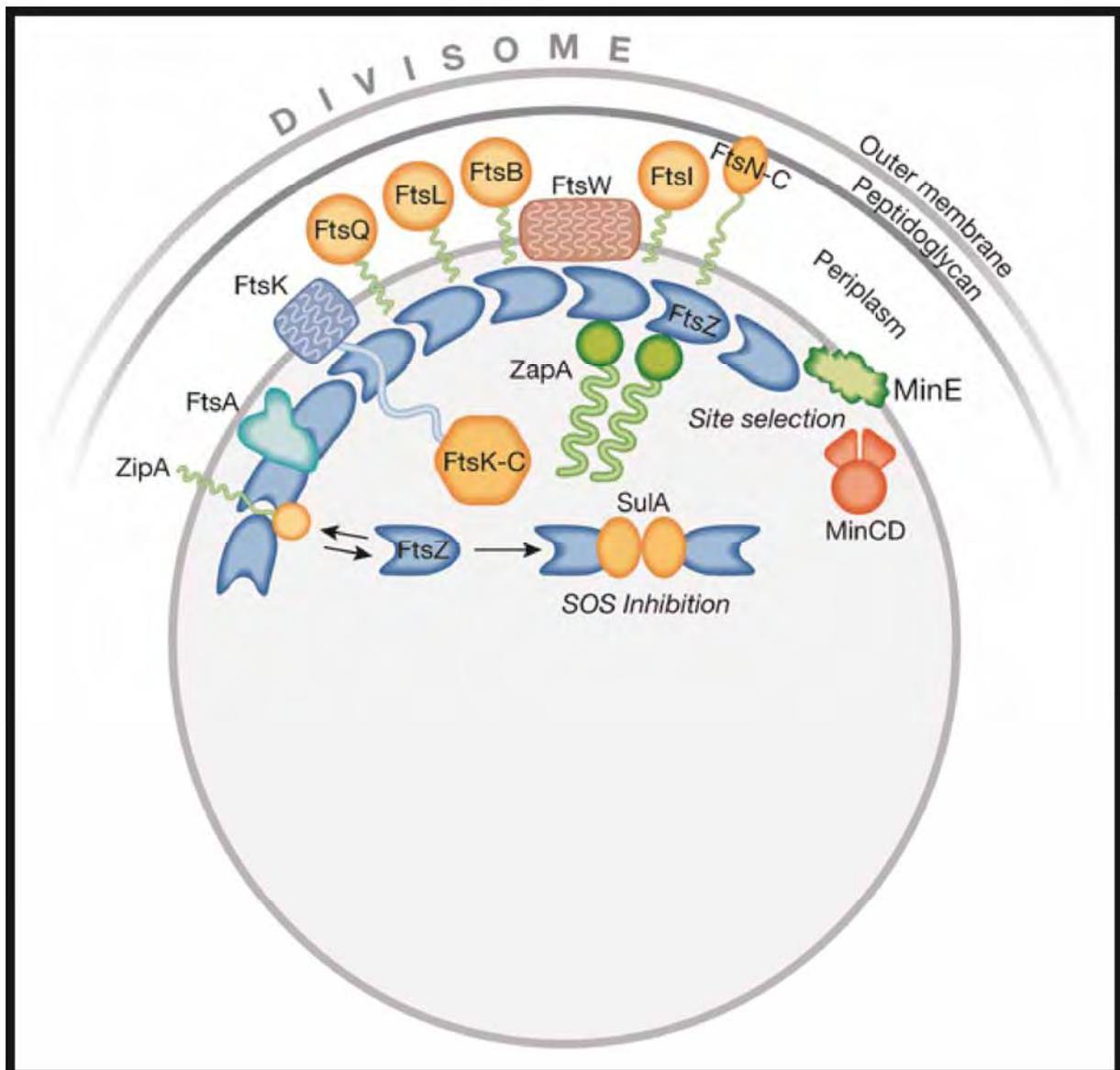
A homologia entre FtsZ e tubulina, também foi notada no início de seu estudo bioquímico (BERMUDES et al., 1994; LOWE; AMOS, 1998; NOGALES et al., 1998), assim como a constatação de sua ubiquidade dentre as bactérias (LUTKENHAUS, 1993).

É verdade que muito do conhecimento inicial que se obteve a respeito da divisão celular procariótica deveu-se a estudos focados somente em *B. subtilis* e *E. coli* e, em alguns casos, com *Caulobacter crescentus*. No entanto, apesar de uma grande distância evolutiva entre tais microrganismos, foi possível notar que o cerne do mecanismo de divisão celular permanece o mesmo: baseado na estrutura do chamado “anel Z” (ERRINGTON et al., 2003), estando presente na absoluta maioria das bactérias, inclusive em Archaea (WANG; LUTKENHAUS., 1996), e até mesmo em organelas como cloroplastos (OSTERYOUNG; VIERLING, 1995) e algumas mitocôndrias (KIEFEL et al., 2004).

Este anel, localizado na região mediana da célula, agrega muitas proteínas além de FtsZ. A formação do septo em local e momento adequado requer controle fino do funcionamento e direcionamento de muitas proteínas, e a todo este conjunto é dado o nome de “divissomo” (NANNINGA, 1998). Na figura 2 um esquema

ilustrativo desta formação pode ser observado, sendo possível notar a associação dentre os monômeros de FtsZ, formando o suporte no qual diversas proteínas são associadas e recrutadas sequencialmente durante o processo de divisão celular. Maiores informações a respeito de algumas destas proteínas serão discutidas mais adiante.

Figura 2: Esquema ilustrando o anel Z formado pela proteína FtsZ e diversas proteínas a ele associadas (VICENTE; LOWE, 2003).



Nas mitocôndrias, observa-se em muitos casos a existência de mecanismos quiméricos, que envolvem tanto o anel Z quanto o modelo baseado em dinaminas,

muito comum em eucariotos (KUROIWA, 2010). Surpreendentemente, descobriu-se em recente estudo que o retículo endoplasmático das células eucarióticas atua pressionando externamente estas organelas, antes mesmo do recrutamento das proteínas internas das organelas, uma faceta impressionante do processo de endossimbiose (FRIEDMAN et al., 2011).

As exceções, embora pontuais, ficam por conta de procariotos intracelulares (BERNANDER; ETTENA, 2010; VAUGHAN et al., 2004), e o filo Crenarchaeota (*Archaea*), que não codificam para FtsZ, sendo intrigante o caso do filo Traumarchaeota, onde apesar de apresentarem *ftsZ* em seus genomas, utilizam para formação do anel a proteína Cdv, estando FtsZ disperso pelo citoplasma (PELVE et al., 2011).

FtsZ atua em um equilíbrio dinâmico, associando-se a outros monômeros de FtsZ, e desassociando-se dos mesmos de maneira contínua. O produto desta associação é um “protofilamento”, com cerca de 30 monômeros (LI et al., 2007) em sua forma ativa durante a divisão celular. Esta associação é inteiramente dependente de GTP, nucleotídeo ao qual FtsZ se liga, entrando em seu estado “ativo” (capaz de ligar-se a outro FtsZ). Após a auto-hidrólise de GTP, o monômero FtsZ-GDP é dissociado do protofilamento, ficando livre no citossol até ser ativado novamente ao ligar-se a um novo GTP (MICHIE; LOWE, 2006; MUKHERJEE; LUTKENHAUS, 1998).

Algum tempo depois de sua identificação, FtsZ foi elencada como um fator central à formação do septo em *E. coli* (BI; LUTKENHAUS, 1991). Posteriormente demonstrou-se que o domínio GTPase é tão importante para que FtsZ forme o “anel Z” que genes mutantes com esta atividade diminuída (*ftsZ84*) formam anéis defectivos. Assim, a associação de FtsZ em protofilamentos – dependente de sua atividade GTPase - é um evento central e bastante preliminar na formação do anel.

FtsZ é a primeira proteína do divisômo a atuar, determinando o local do septo e recrutando as demais proteínas necessárias para sua formação. Entende-se que sua importância decorra de suas duas principais atividades: a primeira é de servir ela própria como um suporte no qual o septo será montado, recrutando continuamente proteínas acessórias para compor a maquinaria divisional (ADAMS; ERRINGTON, 2009). A segunda é a de gerar uma força contrátil capaz de iniciar o invaginamento da membrana plasmática (LU et al., 2000; OSAWA et al., 2008),

apesar de esta função poder estar difusa entre várias proteínas do divisssomo, dado rápido *turnover* de moléculas Z-associadas (STRICKER et al., 2002).

Muitas evidências comprovam esse papel central de FtsZ, dentre elas o fato de que sua ausência parece impedir o processo de septação em momento anterior ao que se observa na ausência das outras proteínas (TASCHNER et al., 1988). Além disso, a localização de FtsZ independe da maioria dessas proteínas diretamente relacionadas ao septo, ao passo que estas dependem de FtsZ para iniciar sua atividade (ADDINALL et al., 1996; BEGG; DONACHIE, 1985).

Parte deste quadro parece estar sendo melhor elucidado, e até mesmo mudando, com a descoberta de novas proteínas. Estas, parecem auxiliar FtsZ a determinar o local correto para a formação do anel, como a recentemente descoberta PomZ (TREUNER-LANGE et al., 2013). Esta proteína parece vir fazer parte do restrito grupo dos reguladores positivos de FtsZ, já descritos anteriormente no gênero *Streptomyces* (WILLEMSE et al., 2011). Estes se posicionam na região central da célula por mecanismo desconhecido e não só independem de FtsZ como são os responsáveis por determinar sua localização. Vale ressaltar que recentemente foi comprovado não serem essenciais os sistemas de regulação negativa em *Bacillus subtilis*, responsáveis pela centralidade do septo (RODRIGUES; HARRY, 2012). Está, portanto ainda em aberto a possibilidade que outros reguladores positivos ainda sejam encontrados em muitas bactérias, fatores cuja importância vem sendo subestimada nos estudos de divisão celular bacteriana.

No entanto, apesar de toda sua importância, FtsZ não está sozinha. Embora seja a principal proteína formadora do septo e, de modo geral, a primeira a demarcar o local onde este deve ser formado, diversas proteínas já foram (e tem sido continuamente) identificadas neste processo.

É interessante notar que, em *E. coli*, FtsZ já está presente na região central da célula, antes mesmo que qualquer invaginação seja visível. Isto indica que o anel Z em si está presente em grande parte do ciclo celular (ADDINALL et al., 1996), e não apenas momentos antes da citocinese, sendo sua estrutura suporte para outras atividades celulares relacionadas (Figura 2).

Por exemplo, caso o aparato de síntese de peptidoglicano (PG) não esteja presente no anel Z, não haverá constrição da célula, o que bloqueia a maturação do divisssomo (ADDINALL et al., 1996). Assim, FtsZ relaciona-se indiretamente a esta via, juntamente com as FtsI (PBP3), FtsW (flipase lipid II) (DE BOER, 2010). Já o

complexo formado por FtsQ/FtsL/FtsB parece conectar o anel Z a proteínas relacionadas à síntese propriamente dita de peptidoglicano (GONZALEZ et al., 2010) etapa sem a qual não há separação das células-filhas.

Muitas outras proteínas são encontradas em associação direta ao anel Z. No entanto, grande parte delas não é essencial às atividades às quais estão relacionadas. Atualmente especula-se a respeito da presença de tais proteínas no divisssomo, havendo a hipótese de que embora não sejam essenciais nos parâmetros avaliados (condições padrão, em meios ricos), tais fatores podem dar robustez ao sistema. Em condições adversas, sob estresse, talvez proteínas consideradas não-essenciais tenham importante papel na manutenção da vida da bactéria (DE BOER, 2010).

Dentre as proteínas essenciais ao processo de divisão além de FtsZ, podemos citar FtsA (citoplasmática) (PICHOFF; LUTKENHAUS, 2005) e também ZipA (transmembrana) (HALE; DE BOER, 1997), que tem a função de ligar o anel Z à membrana plasmática nas gamma-proteobactérias. Este passo mostrou-se um ponto crucial ao correto desenrolar do processo de divisão originando fenótipos altamente deletérios em sua ausência ou perturbação. Recentemente ZipA foi envolvida no processo de síntese de peptidoglicanos, o que contribui para seu caráter essencial na septação (POTLURI et al., 2012).

Em *E. coli* de 15 a 20 proteínas estão no rol das proteínas que são coordenada e sequencialmente montadas no suporte formado por FtsZ, sendo elas essenciais ou não. São elas: ZipA, ZapA, FtsA, FtsE/X, FtsK, FtsQ, FtsL/B, FtsW, FtsI, FtsN, AmiC, and EnvC. (AARSMAN et al., 2005; ERRINGTON et al., 2003; WEISS, 2004).

A proteína ZapA (Z associated protein) foi primeiramente descrita em *Bacillus subtilis* como sendo um polipeptídeo capaz de promover o empacotamento de protofilamentos de FtsZ (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Desde então, diversos estudos têm encontrado homólogos desta proteína em diversos organismos como *Escherichia coli* (SMALL et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (LOW et al., 2004) e até mesmo em mitocôndrias (YOSHIDA et al., 2009).

Sua atividade é baseada em uma dinâmica de dimerização/tetramerização, sabendo-se que ZapA não existe em sua forma monomérica em condições fisiológicas (LOW et al., 2004; PACHECO-GOMEZ et al., 2013). Seu funcionamento mostra-se também intimamente relacionado ao de seu alvo no interior da célula,

sendo a atividade GTPase de FtsZ capaz de modular a ação de ZapA ou vice-versa (MOHAMMADI et al., 2009). Este condicionamento entre tais proteínas é de fundamental importância para garantir que a estabilização de Z não ocorra em momentos inadequados do ciclo celular. É provável também que este tipo de regulação auxilie no correto posicionamento do septo em construção, já que o principal desestabilizador da polimerização de FtsZ, o sistema Min (RASKIN; DE BOER, 1999), é completamente bloqueado pela ação de ZapA (SCHEFFERS, 2008)

A descoberta de novas proteínas associadas ao septo continua: ZapC (DURAND-HEREDIA et al., 2011; HALE et al., 2011) e ZapD (DURAND-HEREDIA et al., 2012) foram recentemente descritas em *E. coli*, embora sua presença em outras espécies ainda precise ser determinada.

1.2.1 Divisão celular em *Xanthomonas* sp.

Com a publicação do genoma de Xac (DA SILVA et al., 2002), muito do que se sabe a respeito desta bactéria começou a ser construído, especialmente através de estudos genômicos comparativos entre Xac e espécies correlatas (MOREIRA et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; JALAN et al., 2011).

Por ser um organismo cujo principal interesse de estudo reside em seu fenótipo patogênico, muito pouco se conhece a respeito de aspectos básicos da biologia celular, como é o caso do processo de divisão celular.

Inicialmente, com a análise do seu genoma, alguns genes foram alocados como provavelmente envolvidos na formação do septo, como as *fts* (*ftsZ*, *ftsW*, *ftsQ*, *ftsI*, *ftsA*, *ftsX*, *ftsJ*, *ftsY*, *ftsK*, *ftsL*, *ftsE*, *ftsB*), inibidores da formação do anel Z (*minCDE*, *sulA*), proteínas de segregação cromossômica (*parAB*) e até mesmo o regulador de síntese flagelar *fleN*.

Posteriormente, o produto do gene XAC3408, inicialmente descrito como hipotético conservado, foi confirmado como sendo ZapA após estudos de sua localização no interior da célula (MARTINS et al., 2010). Desde então nenhuma outra proteína foi descoberta, nem mesmo após as mais recentes determinações de novos elementos, como ZapC (DUF1379) (HALE et al., 2011) e ZapD (DURAND-HEREDIA et al., 2012)

Os estudos iniciados por Martins (2010), com a comprovação do direcionamento de ZapA para o septo, serviram como base para que se pudesse partir para estudos mais aprofundados desta proteína. Tendo-se já comprovada sua função, outros aspectos de sua bioquímica poderiam agora ser avaliados, como a determinação de parceiros de atividade e que consequências sua ausência acarretaria no interior da célula. Assim, o presente trabalho visou preencher estas lacunas no conhecimento desta proteína, os quais serão enumerados a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Determinar o papel da proteína ZapA no processo de septação e virulência em *Xac*

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os parceiros da proteína ZapA, os quais podem revelar as vias nas quais esta proteína atua, inclusive não relacionadas com a formação do septo, caso existam. Isto será possível pela realização de experimento de duplo-híbrido em leveduras contra uma biblioteca genômica de *Xac*.
- Estabelecer possíveis alterações no perfil de expressão de mutantes com cópias extras de ZapA. O objetivo é averiguar se este desbalanço provoca alterações globais no perfil de expressão de proteínas em *Xac*.
- Construção de mutantes com disrupção no gene *zapA* e em seu operon, para determinar se a ausência destes componentes ocasiona perda de virulência em *Xac*.

3 CAPÍTULO I: ANÁLISE DOS INTERACTANTES DE ZapA DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: ENSAIO DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURAS

3.1 Introdução

Desde seu desenvolvimento, ainda na década de 80 (CHIEN et al., 1991; FIELDS; SONG, 1989), o sistema de duplo-híbrido mostrou-se muito útil na determinação inicial de possíveis interactantes para proteínas em estudo. Principalmente com o início dos trabalhos em larga escala (BARTEL et al., 1996; UETZ et al., 2000; RAIN et al., 2001), o sistema foi considerado de crucial importância para que se pudesse determinar, a partir dos parceiros encontrados, as vias bioquímicas nas quais a proteína alvo estava envolvida. Esta possibilidade que se abriu com o uso de tal ferramenta mostrou-se especialmente útil no estudo das inúmeras proteínas hipotéticas identificadas - fruto dos muitos projetos genoma nos anos que se seguiram.

Para que se inicie um estudo de interações de uma proteína de interesse (“isca”) é necessária a construção de uma biblioteca dos possíveis interactantes, dentre os quais alguns serão capturados (“presa”). Há muitas formas de se montar uma dessas bibliotecas, como cDNA, fragmentos gerados por enzimas de restrição, amplificação de genes por PCR e até a geração randômica de fragmentos. Esta última abordagem foi utilizada para a construção da primeira biblioteca de duplo-híbrido a partir do DNA genômico de Xac, a qual foi utilizada neste estudo (ALEGRIA et al., 2004; DOCENA, 2006).

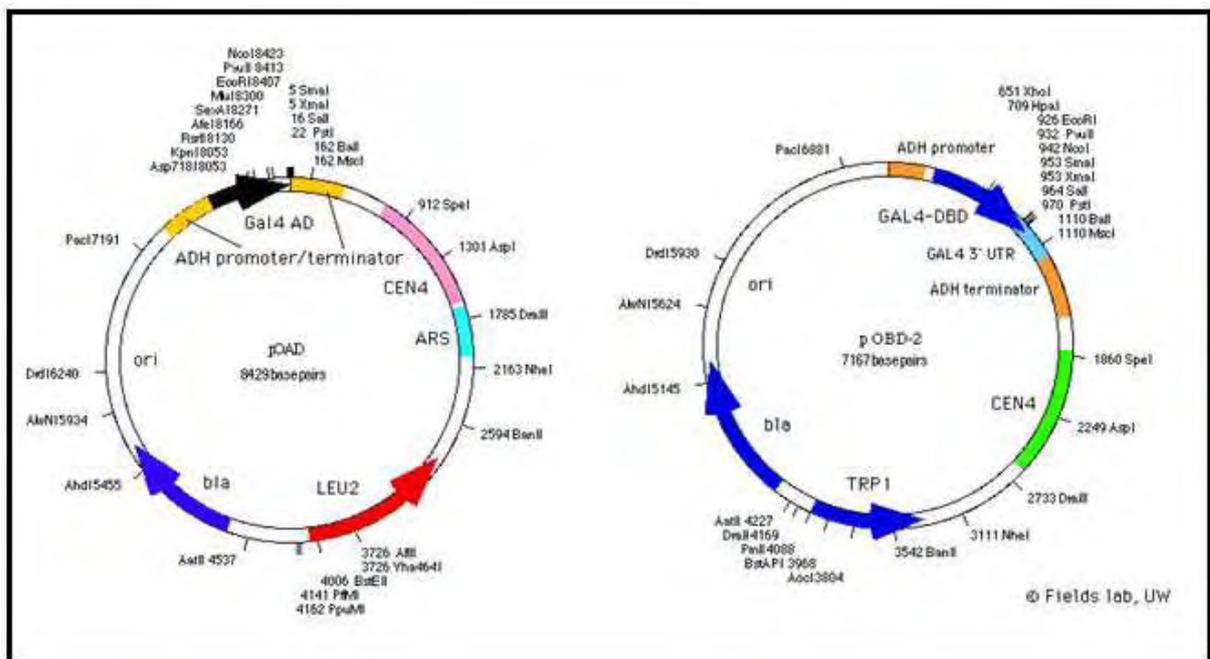
Esta biblioteca foi construída a partir da nebulização de uma extração do material genético de Xac. Neste procedimento, o DNA genômico é forçado a passar por um pequeno orifício, sob pressão. Assim, após purificação, obtêm-se um conjunto de fragmentos aleatoriamente produzidos. Um reparo das extremidades destes produtos faz-se necessária para que a futura clonagem nos vetores da biblioteca seja possível, o que é feito com o uso de enzimas específicas (DOCENA, 2006).

Existem vários sistemas descritos para a realização de estudos de duplo-híbrido, mas a grande maioria deles baseia-se nas propriedades bioquímicas de GAL4. Esta proteína é formada por dois domínios distintos: um responsável pela

ligação ao DNA (*Binding Domain*) e outro pela ativação do complexo de transcrição (*Activation Domain*). Descobriu-se que tais domínios não precisam estar localizados necessariamente no mesmo polipeptídeo para iniciar o processo de transcrição. A proximidade de ambos já é o suficiente para direcionar o complexo e produzir transcritos em linhagens de levedura adequadas, e o conhecimento deste fato possibilitou todo o desenvolvimento da técnica do duplo-híbrido.

Baseando-se nesta característica, foi desenvolvido o sistema AD/BD, onde a proteína “isca” é produzida unida ao *binding domain* (BD) de GAL4 e a proteína “presa”, por sua vez, é expressa unida ao *activation domain* (AD). Para que isso seja possível, existem dois vetores: pOAD e pOBD, cada um deles codificando para um dos domínios separadamente. Um deles será utilizado para a perpetuação da biblioteca produzida, independentemente do meio pelo qual a mesma foi obtida, e o outro será usado para a clonagem dos genes de interesse (Figura 3).

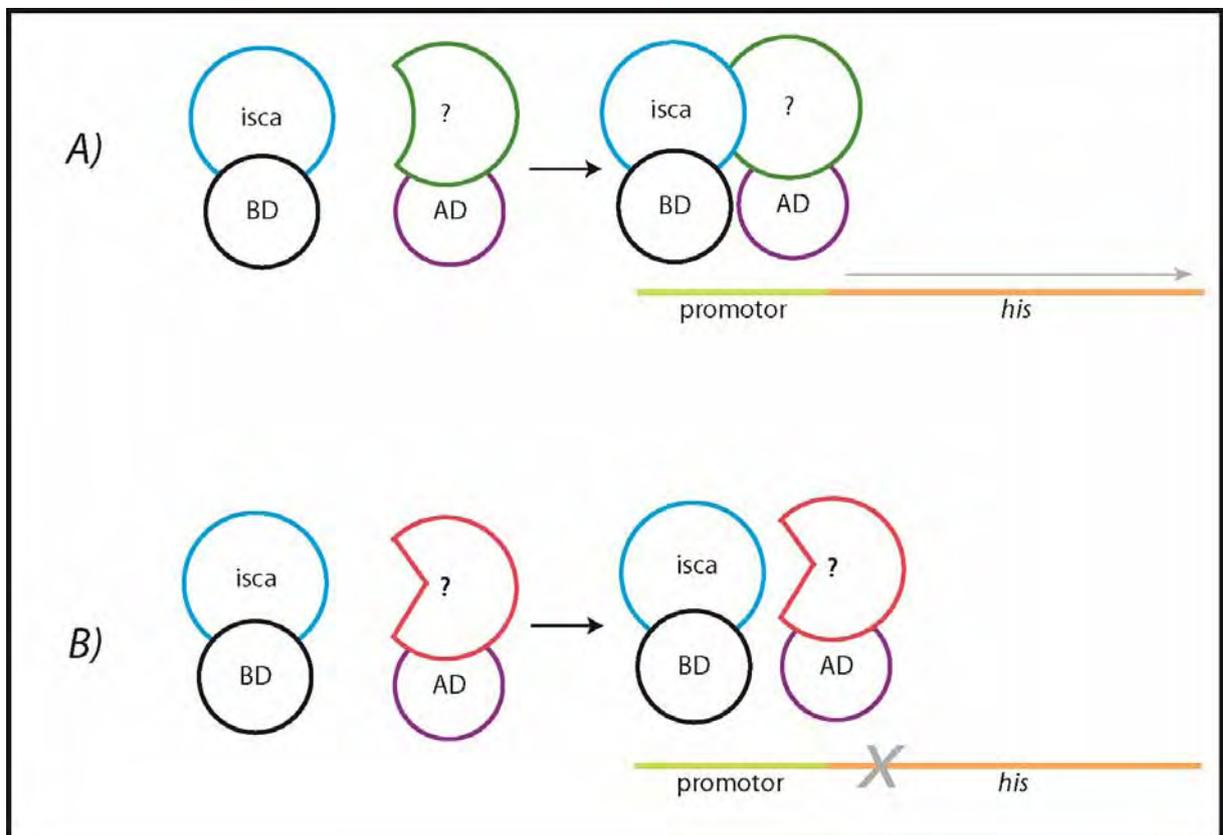
Figura 3: Vetores de clonagem utilizados para o sistema AD/BD de duplo-híbrido (UETZ et al., 2000). Um dos vetores carrega o gene da proteína em estudo (“isca”) e o outro DNA cujos produtos podem ou não interagir com a proteína-alvo (“isca”). (FIELDS, 2013).



Montado o sistema, procede-se à transformação da levedura e nela ocorrerá a seleção das interações positivas, pois os domínios AD e BD são aproximados

quando existe uma afinidade entre proteínas que estão unidas a ele (Figura 4). Esta aproximação irá possibilitar a transcrição de um gene repórter, que pode ser desde o clássico *lacZ* (alterando a coloração da colônia) a um gene que possibilite o crescimento auxotrófico de leveduras, na ausência de histidina (*his*), uracila (*ura*) ou adenina (*ade*). No caso do sistema utilizado no presente estudo, o gene repórter utilizado na recuperação dos clones foi *his*, já que o aminoácido histidina não foi suplementado no meio de cultura após a transformação da biblioteca. Assim, somente as linhagens com aproximação dos domínios AD/BD e, conseqüentemente, capazes de sintetizar este aminoácido seriam capazes de crescer, possibilitando a identificação dos interactantes.

Figura 4: princípio de funcionamento do duplo-híbrido em leveduras. A) proteína isca, unida ao domínio BD interage com peptídeo proveniente da biblioteca em uso (“?”), a qual é expressa unida ao domínio AD. A aproximação dos domínios AD e BD, decorrente da afinidade entre as proteínas isca e a presa (“?”) acaba por possibilitar a expressão do gene repórter, neste caso, a capacidade de sintetizar o aminoácido histidina. B) No caso de ausência de interação entre a proteína isca e aquela proveniente da biblioteca, não haverá interação e, conseqüentemente, a linhagem de levedura será incapaz de sintetizar o aminoácido histidina, morrendo em meio de cultura no qual este não é suplementado



No entanto, muitos gargalos existem na técnica em si, como o número de falso-positivos, ainda considerado grande. Além do mais, o duplo-híbrido é capaz apenas de selecionar interações binárias entre uma proteína de interesse, o que acaba por impedir o descobrimento de interações que dependam de associações múltiplas (embora exista o “*yeast three-hybrid*” (ZHANG et al., 1999), este é utilizado apenas para interações protéicas RNA-dependentes). Outro fator limitante é a necessidade de que o complexo seja capaz de adentrar o núcleo da levedura o que, dependendo do tamanho e conformação das proteínas, pode impedir a detecção da interação.

Em suma, o principal objetivo no uso desta técnica no presente estudo foi o de determinar os potenciais parceiros de atividade de ZapA em *Xac*. Com estes dados, as vias bioquímicas nas quais esta proteína possivelmente atua puderam ser conhecidas, abrindo margem a novos estudos que visem aprofundar o estudo de ZapA e até mesmo outras proteínas do septo em *Xac*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 PCR e clonagem no vetor pOBD

Os fragmentos de ZapA^{Xac} foram obtidos por PCR a partir dos primers zapA_Y2H F (5'AAACCATGGTGAGCAACAACGAACCGGTC) e zapA_Y2H R (5'AAAGTCGACTCAGCGCGGTGTGTCGGCAAC) com o uso de Pfu DNA polimerase. O ciclo utilizado foi de desnaturação inicial de 95 °C durante 5 min seguido por 35 ciclos de PCR touchdown: 95 °C durante 30 segundos, 68 a 55 °C durante 30 segundos e 70 °C durante 1 minuto.

Os produtos foram purificados com o uso do kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e clonados no vetor pJET (Fermentas) para subsequente restrição com as enzimas NcoI/Sall (Fermentas), sendo este último passo também realizado com o vetor pOBD.

Os produtos dessas reações foram purificados com o uso do kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e ligados com o uso de ligase 400u/μl (NEB) conforme instruções do fabricante e transformados em células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B (*F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL (Str^R) nupG*), onde os clones obtidos passaram por triagem para confirmação da ligação dos insertos, originando o vetor pOBD-zapA. Posteriormente o clone selecionado foi sequenciado para checagem mais detalhada e suas fronteiras e para descartar a existência de mutações indesejadas. Em todas estas etapas, as células foram cultivadas em meio LB, acrescido de ágar e antibióticos quando necessário (SAMBROOK et al., 1989).

3.2.2 Transformação de pOBD-zapA em levedura

O produto pOBD-zapA foi transformado na linhagem de levedura PJ69-4α de *Saccharomyces cerevisiae* (JAMES et al., 1996), em protocolo baseado em Docena (2006), onde mais detalhes deste procedimento podem ser obtidos.

As células foram crescidas em meio sólido YAPD (extrato de levedura 1%, peptona 2,5%, adenina 0,008%, glicose 2%, pH~5,6) durante 48 horas, quando um volume de aproximadamente 25 μL foi coletado. As células foram lavadas em água e

ressuspensas em solução composta por 240 µL de PEG 50%, 36µl acetato de lítio 1 M, 50 µL de esperma de salmão 2 mg/mL (desnaturado), 4 µL de DNA (pOBD-*zapA*) e 30 µL de água. Após homogeneização, os tubos foram mantidos em banho a 42°C p durante 30 minutos, sendo agitados a cada 5 minutos, para evitar a sedimentação das células. Em seguida, os tubos foram centrifugados (3.000xg durante 30 segundos), o pellet obtido foi ressuspenso em 400 µL de água e após 5 minutos espalhados em placas contendo o meio SC (YNB 4 g, glicose 12 g, mistura de aminoácidos “*drop-out*” 0,5 g, Agar 10 g qsp 600 mL água e pH 5,6 - 6,0) desprovido do aminoácido triptofano (SC-W), e suplementado apenas com histidina, adenina e leucina (12 mg, 40 mg e 18 mg respectivamente para qsp 600ml), o que propiciará a seleção dos clones positivos. (*drop-out* mix: 2 g lisina, 2 g isoleucina, 2 g arginina, 2 g metionina, 2 g fenilalanina, 2 g serina, 2 g treonina, 2 g tirosina, 1,2 g uracila, 9 g valina. Todos estes componentes são macerados em almofariz para completa homogeneização e posterior uso).

Os clones obtidos passaram pelo teste de auto-ativação, onde 5 uL de uma suspensão da cultura (massa celular de aproximadamente 25 µL em 1 mL de água estéril) foi diluída em 1 mL de água estéril e 100 µL foram plaqueados em meio SC-W e SC-WH contendo quantidades variadas do composto 3-aminotriazol (3AT): 3 mM, 5 mM e 10 mM, para determinação do ponto no qual não há crescimento visível em placa. Foi selecionado para utilização nos experimentos subsequentes o meio contendo adição de apenas 3mM deste composto, quantidade mínima necessária para este sistema AD/BD.

3.2.3 Transformação contra a biblioteca de Xac e triagem para falso-positivos

Um repique fresco da linhagem PJ69-4α transformada com o vetor pOBD-*zapA* em meio SC-W foi inoculado para crescimento *overnight* em 50 mL neste mesmo meio . Após o crescimento, as células foram coletadas (4000 rpm durante 5 minutos) e ressuspensas e crescidas em 150ml de meio YAPD até D.O. 2 (para as fórmulas destes meios de cultivo, ver item 3.2.2).

Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação conforme descrito acima, ressuspensas em 3 mL de acetato de lítio 100 mM e incubadas a 30°C em banho-maria por 15 minutos. Na sequencia foram novamente coletadas por

centrifugação e ressuspensas na seguinte solução: 7,2 mL de PEG 50 %, 1,08 mL acetato de lítio 1 M, 1,5 mL de esperma de salmão 2 mg/mL, 30 µL de DNA da biblioteca e 990 µL água. O DNA da biblioteca acima referido já encontrava-se nas diluições apropriadas para cobertura maximizada do genoma, tendo sido gentilmente cedido nesta preparação por M. Andrade do lab. do prof. S.C. Farah – maiores detalhes sobre a preparação da biblioteca estão em Docena (2006).

A suspensão foi mantida em banho-maria a 30 °C por 15 minutos e na sequência a 42 °C por 45 minutos (o tubo foi agitado a cada 5 minutos para evitar a sedimentação das células). Após centrifugação (4.000 rpm/5 minutos) o *pellet* foi ressuspensão em 9 mL água estéril e espalhado em placas contendo o meio SC-WHL 3 mM 3AT (conforme descrito no item 3.2.2 mas com suplementação apenas de adenina) e mantidos a 30 °C até o aparecimento das colônias (aproximadamente 5 dias foram suficientes neste caso)

Para fins de controle de transformação uma alíquota de 10 µL da suspensão foi diluída em 1 mL de água estéril, e 100 µL foram plaqueados em meio SC-WL 3 mM de 3AT para contagem dos transformantes e validação do experimento.

Após o crescimento das colônias após a transformação as linhagens obtidas foram, uma a uma, repicadas em meio SC-WHAL (sem suplementação de aminoácidos, conforme item 3.2.2). Este repique tem por finalidade descartar interações fracas entre proteínas, as quais ocasionam, pela presença de gene repórter específico *ade*, o aparecimento da coloração rósea nas linhagens. Foram separados, portanto, para o sequenciamento e identificação de interactantes apenas aquelas colônias que estavam brancas neste meio.

3.2.4 Miniprep de leveduras

Devido à grande quantidade de transformantes inicialmente obtidos (aproximadamente 500), o protocolo de extração plasmidial de leveduras inicialmente utilizado (conforme utilizado pelos alunos do prof. S. Valentini FCFAR UNESP Araraquara) foi adaptado para uso em placa.

Em placas deep-well com capacidade para 2 mL, foram crescidas individualmente as linhagens de leveduras em meio SC-L (meio SC suplementado com 25 mg de Trip, 18 mg de His e 40 mg de Ade) por 24-30h.

As placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, e o *pellet* foi lavado em água estéril por uma vez. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em 80 µL do Tampão de Lise (2 % tritonX-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8) e transferidos para strips de eppendorfs (capacidade 200 µL) contendo aproximadamente 300 mg de Glass Beads e 80 µL de PCI (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico). Após vórtex vigoroso por cerca de 5 minutos, a placa foi centrifugada a 4000rpm durante 5min e a fase superior aquosa foi transferida para placa álcool-resistente, onde o mesmo volume de isopropanol gelado foi adicionado e misturado por inversão após selagem da placa com selo álcool-resistente.

Para a precipitação do DNA a placa foi centrifugada a 4000rpm durante 45 min a 20 °C, sendo o sobrenadante posteriormente descartado. Após lavagem do precipitado com etanol 75 % gelado, a placa foi seca em estufa ou bancada e o DNA ressuspensão em 50 µL de água MiliQ durante algumas horas em geladeira.

3.2.5 Transformação em *E.coli* KC8

Dada a natureza da extração plasmidial de leveduras, o sequenciamento direto de seu DNA não é possível. Assim, para que pudéssemos identificar os genes da biblioteca que haviam interagido com ZapA^{Xac}, o material extraído das leveduras foi re-transformado em células de *E. coli* para posterior miniprep destas células..

A linhagem KC8 (*hsdR*, *leuB600*, *trpC9830*, *pyrF::tn5*, *husB463*, *lacDX74*, *strA*, *galU,K*) foi utilizada, portanto, para o isolamento do vetor pOAD por miniprep. Para o preparo da célula competente, uma cultura saturada *overnight* crescida em meio líquido 2YT (1,6 % triptona, 1 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl) foi inoculada na proporção de 1:100 no mesmo meio a 37 °C e 180 rpm até DO~0,6. O pellet obtido por centrifugação foi lavado de 1 a 2 vezes em meio volume de água MiliQ, com ressuspensão final de 1 ml para cada 200 mL de meio de cultivo inicial. Para a transformação, 40 µL desta suspensão de células foram utilizados, com a adição de 1 µL do DNA plasmidial obtido das leveduras. A eletrotransformação foi executada em cuvetas de 0,2 mm (parâmetros: 100 ohms, 50 µF e 1,8 kV) e após o choque, as células foram recuperadas em 800 µL de meio 2YT. Após breve incubação a 37 °C por alguns minutos, 200 µL da transformação foram plaqueados em meio mínimo M9

(SAMBROOK, 1989) suplementado com os aminoácidos uracila (20 mg/L), histidina (20 mg/L) e triptofano (40 mg/L).

As células tiveram seu DNA plasmidial coletado por miniprep para posterior sequenciamento, o qual foi realizado pela Macrogen Inc (Coréia).

3.2.6 Análise dos dados

A identificação dos genes obtidos em pOAD como presas de ZapA^{Xac} foi realizada por Blastn dos dados obtidos pelo sequenciamento contra o genoma de Xac disponível online no banco público NCBI. Posteriormente os resultados dos sequenciamento foram um a um re-checados para busca do frame correto e determinação do domínio protéico capturado.

Para as análises realizadas em cada uma das presas, foram utilizadas ferramentas de bioinformáticas de uso público como : para a busca por domínios conservados CDD (MARCHLER-BAUER et al., 2013) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>), predição de domínios transmembrana pelo algoritmo DAS (CSERZO et al., 1997) (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), vias e operons de genes pelos BioCyc e EcoCyc (<http://biocyc.org/> e <http://ecocyc.org/>), para análise de algumas enzimas CAZy (<http://www.cazy.org/>) e para a localização subcelular predita o PSORTb 3.0 (YU et al., 2010) (<http://www.psort.org/psortb/>) .

3.3 Resultados e discussão

Após a clonagem do gene *zapA* no vetor pOBD e a realização do experimento de duplo-híbrido contra a biblioteca de Xac (conforme descrito em Material e Métodos), o sequenciamento dos clones pOAD obtidos resultou na seguinte lista de possíveis interactantes (Quadro 1).

Todas as proteínas listadas no quadro foram testadas e confirmadas como interações positivas [as 63 interações obtidas com KfrA, PthA e TolC são consideradas propensas a serem falso-positivos conforme descrito em (ALEGRIA et al., 2004)]. Evidentemente esta confirmação não garante que tais interações sejam biologicamente ativas em Xac. Por este experimento exclui-se apenas a possibilidade de que alguma das presas obtidas seja auto-ativadora do sistema, característica de certas proteínas que ocasionam por si só o crescimento das colônias por ativação dos genes repórteres.

A presa que mais esteve presente nesta análise foi a própria proteína ZapA (a partir de agora chamada de ZapA^{Xac}), utilizada como isca no experimento. Este resultado corrobora o que já está descrito na literatura (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002), onde ZapA foi descrita com sendo uma proteína dimérica e cuja atividade é essencialmente realizada por tetrâmeros em condições fisiológicas (PACHECO-GOMEZ et al., 2013). Assim, ZapA^{Xac} deve seguir o padrão de conformação dimérica/tetramérica típica das proteínas ZapA descritas em outros organismos.

Uma importante ausência notada na análise foi a de FtsZ, o parceiro/alvo clássico de ZapA, assim como outras proteínas Fts. Poderíamos explicar esta ausência de muitas maneiras, iniciando-se pelo simples fato de que o ambiente bioquímico da levedura simplesmente possa não favorecer sua interação com ZapA^{Xac}. Ainda existe a possibilidade de que ZapA^{Xac} forme complexos muito grandes entre seus tetrâmeros e monômeros de FtsZ, os quais seriam incapazes de adentrar os poros nucleares da levedura ou para propiciar aproximação estérica dos domínios AD/BD que seja favorável ao início de transcrição. Vale ressaltar que Docena (2006) utilizou FtsZ como isca durante o processo de análise da biblioteca construída, e ZapA não foi uma presa obtida, tendo sido capturadas apenas FtsZ e Xac 1696 como presas válidas.

Experimentos de duplo-híbrido realizados em bactéria com o uso da proteína ZapA de *Streptococcus pneumoniae* como isca revelou que ela de fato interage com diversas proteínas Fts quando estas foram colocadas como presa (MAGGI et al., 2008).

Resultado similar ao obtido por MAGGI (2008) foi observado em *E. coli*, em experimentos de FRET. Neste caso ZapA pareceu estar em proximidade significativa com as FtsN, FtsZ e FtsI (ALEXEEVA et al., 2010)– nenhuma destas observadas como interactantes de ZapA^{Xac}, por razão desconhecida, não estando descartado que ZapA^{Xac} exerça papel ligeiramente distinto daquele já descrito para outras bactérias.

Nos estudos realizados até o momento com o uso da biblioteca de Xac utilizada no presente estudo, incluindo-se os trabalhos de Docena (2006) e Alegria (2004), a proteína ZapA nunca foi pega como presa das iscas utilizadas. Isto provavelmente deve-se ao fato de que tais avaliações restringiam-se à determinação dos parceiros de atividade de proteínas relacionadas aos sistemas de virulência e de de dois componentes, sinalizando que ZapA não deve participar diretamente destas vias.

A presa que mais aparece representada nesta avaliação realizada de ZapA^{Xac}, foi a própria ZapA^{Xac}, imediatamente seguida pela ORF XAC3407. Esta é uma pequena proteína, até o momento hipotética, e que apresenta domínio conservado TIGR02449, o qual parece ser conservado dentre as proteobactérias. Devido à interessante característica observada nesta interação, a ORF XAC3407 foi selecionada para estudos posteriores de disrupção gênica (ver Capítulo III).

A seguir analisamos brevemente o papel das principais proteínas com base em sua possível relação com ZapA^{Xac}.

Quadro 1: Lista de possíveis interactantes de ZapA^{Xac} após experimento de duplo-híbrido e sequenciamento das presas pOAD. As três primeiras ORFs (sublinhadas) correspondem às presas obtidas em maior quantidade; as demais estão agrupadas de acordo com sua categorização funcional. Presas relativas às proteínas previamente identificadas como falso-positivos (PthA, TolC e KfrA) não são mostradas. * em números absolutos e # conforme a base e dados NCBI, \$ classificação de ZapA ainda não contempla a recente determinação do produto de XAC3408, anteriormente hipotético.

ORF	Proteína (gene)	Classe funcional [#]	Quantidade de presas *
<u>XAC3408</u>	<u>ZapA</u>	hipotética ^{\$}	<u>107</u>
<u>XAC3407</u>	<u>hipotética</u>	<u>hipotética</u>	<u>34</u>
<u>XAC2529</u>	<u>RhsD (rhsD)</u>	<u>Indefinida</u>	<u>18</u>
XAC0360	Glicerol-3-P desidrogenase (<i>glpD</i>)	Metabolismo Intermediário	1
XAC0361	Glicerol-3-P repressor (<i>glpR</i>)	Metabolismo Intermediário	2
XAC0610	Histidina-quinase-regulador de resposta	Metabolismo Intermediário	2
XAC1136	Propionate catabolism regulator protein (<i>prpR</i>)	Metabolismo Intermediário	2
XAC1716	CTP sintetase (<i>pyrG</i>)	Metabolismo Intermediário	1
XAC1933	RNA polimerase sigma factor (<i>fliA</i>)	Metabolismo Intermediário	1
XAC4154	Transcription regulator (<i>fldY</i>)	Metabolismo Intermediário	2
XAC1101	Heat-shock protein G	Biossíntese de Pequenas Moléculas	1
XAC0631	Peptidase II / oligopeptidase (<i>ptrB</i>)	Metabolismo de Macromoléculas	1
XAC1653	Seril-t-RNA sintetase (<i>serS</i>)	Metabolismo de Macromoléculas	2
XAC1176	Glicosil hidrolase (<i>srfJ</i>)	Estrutura Celular	1
XAC2985	Amino acid transporter (<i>gabP</i>)	Processos Celulares	1
XAC3229	Co-integrase resolution protein T (<i>orfT</i>)	Elementos Genéticos Móveis	3
XAC4352	Glutathione-S-transferase (<i>gst</i>)	Patogenicidade, Virulência e Adaptação	1
XAC0085	VIII - hipotética	hipotética	1
XAC0102	VIII - hipotética	hipotética	2
XAC0424	VIII - hipotética	hipotética	3
XAC0886	VIII - hipotética	hipotética	1
XAC1388	VIII - hipotética	hipotética	1
XAC2273	VIII - hipotética	hipotética	3

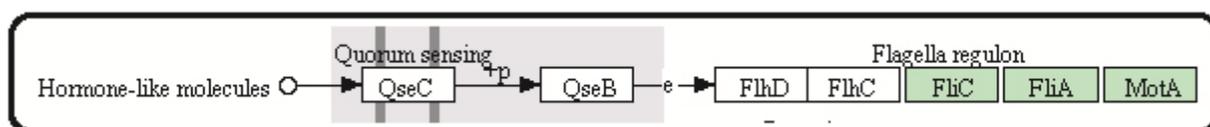
3.3.1 Síntese flagelar e reguladores: XAC1933 (FliA), XAC0424, XAC4154 (FliY) e XAC0610 (Histidina quinase – regulador de resposta)

Além da função básica relacionada à mobilidade, o flagelo está envolvido na execução de diversos processos celulares. Isto vem sendo comprovado para muitas bactérias como *Campylobacter* spp. onde esta estrutura é requerida à secreção de proteínas não-flagelares de virulência e adesão, além de deixar à cargo do regulon dos componentes do flagelo a expressão de fatores de virulência (KONKEL et al., 2004) (GUERRY, 2007).

Este fenômeno é especialmente interessante nas bactérias que perderam o componente flagelar, como as intra-celulares obrigatórias. Nestas bactérias, muito de seus fatores de virulência são ainda regulados por resquícios do sistema flagelar, mesmo na ausência desta estrutura. É o caso da gamma-proteobacteria *Buchnera aphidicola*, um endossimbionte obrigatório de afídeos. Estas bactérias, apesar de sequer possuírem o gene que codifica para flagelina, expressam aqueles requeridos para a construção do corpo basal do flagelo (MAEZAWA et al., 2006). Assim, dada a característica redução de genoma deste tipo de organismo, fica evidente a importância desta função - não tão óbvia - do sistema flagelar, que acaba por se envolver com outros processos celulares, que não a mobilidade.

XAC1933 (FliA) (sinônimos: RpoF, FlaD, sigma F, $\sigma 28$) está designada no âmbito da via metabólica dos sistemas de dois componentes em XAC na base de dados KEGG, não sendo ela em si um dos dois componentes do sistema, mas uma das proteínas por ele induzidas (Figura 5). Ela atua como um fator sigma em Xac, dirigindo a alteração do perfil de expressão da bactéria sob determinadas condições.

Figura 5: Via regulatória do sistema de dois componentes no qual FliA esta envolvida. O sensor QseC é ativado ao receber sinal externo, fosforilando QseB, proteína responsável pela subsequente expressão dos componentes à direita da seta (KEGG).



XAC1933 está em uma região (entre XAC1330 – XAC1957) relacionada com a síntese do motor flagelar (MOREIRA, 2006), uma etapa posterior à sua síntese estrutural, embora atue também na regulação de FliC. No entanto, este sigma

parece exercer controle em um espectro muito mais amplo sistemas, que não o flagelar.

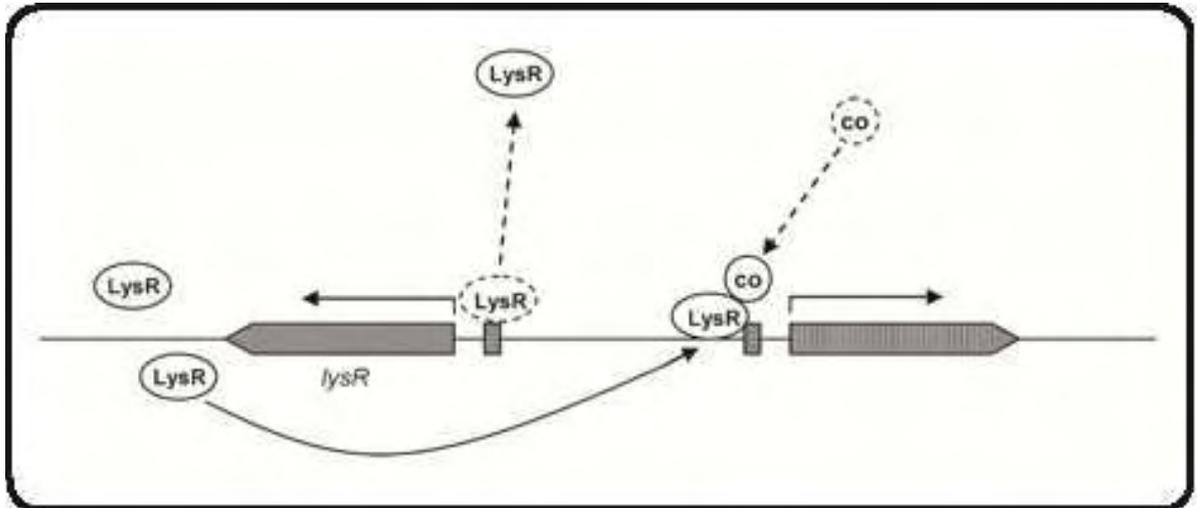
O caráter de regulação “tardia” dos componentes flagelares já está estabelecido para FliA em *Xanthomonas campestris*, onde se sugere que ela atue regulando genes relacionados à quimiotaxia e mobilidade, além dos componentes *fliC*, *flgM* e *fliD* (YANG et al., 2009). Os autores ressaltam que muitos dos genes possivelmente regulados por FliA contêm domínios GGDEF, e dentre as 5 ORFs citadas, foi possível encontrar homólogos em Xac (entre os parênteses): XCC0407 (**XAC0424**); XCC1443 (XAC1486); XCC1777 (XAC1795); XCC3519 (XAC0614) e XCC3546 (XAC0593)

A ORF **XAC0424 (hipotética)** mencionada acima foi também detectada como presa de ZapA^{Xac} neste experimento de duplo-híbrido. Ela parece ser conservada na família *Xanthomonadaceae* e está designada, apesar de ainda ser hipotética, na categoria funcional “signal transduction mechanisms”, da base de dados COG. Isto reforça a idéia de que FliA atue em Xac de maneira similar ao que já foi descrito por YANG (2009), sendo a relação de ZapA^{Xac} neste processo ainda desconhecida.

Já outra ORF, **XAC4154 (FIdY)**, conservada dentre as proteobactérias, apresenta em sua estrutura domínio conservado que aponta ser esta proteína um regulador transcricional da família *LysR*, com duas estruturas helix-turn-helix (HTH) N-terminais além de sítios de dimerização.

Esta família de reguladores é a mais abundante dentre as bactérias (HENIKOFF et al., 1988), havendo homólogos inclusive em *Archaea* (PEREZ-RUEDA; COLLADO-VIDES., 2001). Estes são fatores de transcrição que exibem um sistema de auto-regulação negativa (Figura 6), e cuja atividade não se encontra limitada à regulação de rol específico de genes. Seu espectro é bastante amplo, variando do metabolismo básico de nutrientes a vias específicas de virulência (MADDOCKS; OYSTON, 2008). Assim, não há padrão específico estabelecido a respeito de função e/ou vias nas quais essas proteínas atuam.

Figura 6: Representação do modelo de funcionamento dos reguladores transcricionais da família LysR. A presença da proteína LysR bloqueia sua própria expressão e a de outros genes ao se ligar a um promotor por ela reconhecido. Na presença de co-fatores específicos, o promotor é liberado, ocasionando a transcrição. (MADDOCKS; OYSTON, 2008)



Embora FldY esteja designada como parte do sistema de regulação flagelar, os reguladores LysR apresentam certo grau de promiscuidade no que diz respeito à estridência com a qual selecionam os promotores que ativam (KNAPP; HU, 2010). Assim, FldY pode atuar de maneira mais ou menos específica em alguma via regulatória do próprio processo de divisão celular e isto poderia explicar (em parte) sua associação com a proteína ZapA^{Xac}. Por outro lado, o fato de que mais de uma proteína relacionada ao metabolismo flagelar ter sido encontrada como presa para ZapA^{Xac} abre margem ao fato de que estes processos de divisão celular e biossíntese flagelar estariam interconectados em Xac por intermédio de ZapA^{Xac}.

A comunicação entre estas vias já foi descrita anteriormente. Em *Caulobacter crescentus*, observou-se que células depletadas dos fatores FliD ou FliX apresentavam fenótipo de filamentação, o que sugere uma relação direta entre tais proteínas com o sucesso da conclusão da citocinese. Neste caso específico, o acoplamento destas vias parece ocorrer em estágio mais avançado do processo de divisão, já que as células, apesar de filamentadas, apresentam invaginação da membrana plasmática ao longo do filamento (MUIR et al., 2005).

Ambas Xac e *Caulobacter crescentus* apresentam um único flagelo polar, sintetizado uma única vez durante o ciclo da célula. Esta característica pode explicar a dependência mútua entre a formação do flagelo e septo já que, se o primeiro é

interrompido, o divisssomo não poderia prosseguir com o processo de divisão, para que a célula-filha seja formada completamente (e isso inclui o flagelo) antes da separação total das células.

Há muito se sabe que o *início* da síntese flagelar dá-se somente quando a célula começa a duplicar seu cromossomo (DINGWALL et al., 1992), não havendo interferência do estado de septação neste processo (MUIR et al., 2005). No entanto, em células sem FtsZ apesar de se observar a formação completa do flagelo, estes permaneciam imóveis, sem que sua maquinaria motora fosse funcional (MUIR et al., 2005). Evidências como estas embasam ainda mais a interdependência que deve existir entre o divisssomo e a biossíntese de flagelo. Vale lembrar que XAC1933 (FliA) está localizada exatamente em região genômica dedicada ao motor flagelar, assim como é sua via de expressão após estímulo pelo sistema QseBC (que em Xac leva o nome de YgiXY) .

Sabe-se que, para muitas bactérias, FliA é um regulador sensível a aumentos de temperatura, ocasionando bactérias não-móveis após certo tempo sob este estresse (KAPATRAL; MINNICH, 1995). Dados recentes obtidos em nosso laboratório (J. A. P Sumares, em preparação) apontam que o mesmo pode ocorrer em Xac, já que após choque térmico a 37°C observamos uma sincronização das células na etapa final de montagem do septo. Este efeito pode ser uma consequência da parada de montagem dos componentes flagelares, o que ocasiona suspensão da citocinese.

Em Xac, o que experimentalmente já foi determinando que este sistema está relacionado aos processos de montagem da estrutura flagelar e sua importância biológica para Xac (MALAMUD et al., 2011), sabendo-se que existe certa interdependência entre a formação de biofilmes e a mobilidade. Nada até o momento foi averiguado a respeito da regulação de todo este processo.

Ainda na linha da regulação de sinais bioquímicos, o experimento de duplo híbrido realizado apresentou a possível interação entre ZapA^{Xac} e **XAC0610**, cujo produto está anotado como sendo uma “proteína híbrida histidina quinase - regulador de resposta”. A designação “híbrida” faz referência a proteínas sensoras que carregam o domínio sinalizador histidina quinase (HK) e seu regulador de resposta (RR) cognato ao invés de tais domínio estarem localizados em diferentes proteínas, a conformação mais comum e que origina o nome “sistema de dois componentes”.

A análise de XAC0610 aponta para a existência de três diferentes domínios conservados: domínio **GAF**, domínio **PAS** e domínio **GGDEF**. O primeiro e o segundo apresentam estruturas capazes de aprisionar pequenas moléculas (cGMP, heme, radicais, etc.), as quais atuam como sinalizadoras para diversas vias (ARAVIND; PONTING, 1997) (HO et al., 2000) (TAYLOR; ZHULIN, 1999). Já GGDEF é um domínio capaz de sintetizar cGMP e cAMP além de diguanilato ciclase, todas estas utilizadas como “mensageiros” bioquímicos para diversos processos celulares.

Chama a atenção o fato desta proteína não apresentar nem o domínio que caracteriza as HKs tampouco o domínio dos reguladores de resposta. A estrutura apresentada pelo produto de XAC0610 não se encaixa em nenhuma das definições estabelecidas até o momento para uma HK. Em alguns genomas relacionados à *Xac*, podemos observar que nem sempre os homólogos desta proteína encontram-se sob este nome, estando designados de maneira mais genérica como “sensor protein” (XCV), “GAF protein Fh1A” (*Xanthomonas axonopodis* pv. citrumelo F1) ou “diguanylate cyclase sensor protein” (XCC str. B100).

Ainda assim, a presença dos domínios **GAF**, **PAS** e **GGDEF** não deixam dúvida quanto à sua natureza sinalizadora. Embora XAC0610 claramente não seja uma proteína HK e que esta denominação se deva a um erro de anotação, poderíamos encaixá-la em outra categoria já descrita: os reguladores pertencentes ao “sistema de um componente” (ULRICH et al., 2005).

As cópias desta proteína que foram detectadas no duplo-híbrido não apresentavam seus primeiros 100 aminoácidos (102 e 104 precisamente), não estando, portanto, completas. Por esta observação poderíamos inferir que a interação entre ZapA^{Xac} e esta proteína sensora não deve ocorrer no domínio GAF, já que este estaria pela metade quando expresso pelo vetor pOAD, estando intactos, portanto, os domínios seguintes.

O domínio PAS é exclusivamente citoplasmático e até mesmo presente em cópias de HK canônicas não somente em *Xac*. Ele encontra-se ubiquitadamente distribuído dentre os três grandes domínios: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* (multicelulares também). Sua função pode ser variável, permitindo a percepção de diferentes estímulos como pequenos ligantes (heme, nucleotídeos etc), disponibilidade de oxigênio e potencial redox (TAYLOR; ZHULIN, 1999). Uma característica interessante deste domínio é sua possível ligação à percepção de

ciclo circadiano e percepção de luz, algo que somente agora começa a ser estudado para Xac, após a recente descoberta da proteína LOV, ligada à fotopercepção e que contém o domínio PAS (KRAISELBURD et al., 2012). Vale ressaltar que sendo Xac uma bactéria exposta a ciclos de claro/escuro, a percepção deste tipo de sinal ambiental pode ser mais importante do que se poderia inicialmente imaginar. Para a *Synechococcus elongatus* já se tem bem estabelecido o papel deste tipo de sincronizador luminoso, o qual comprovadamente orienta o processo divisão celular, sendo FtsZ expresso de maneira cíclica durante o período de 24hdo dia (MORI; JOHNSON, 2001) (MORI et al., 1996). Embora existam processos de sincronização entre Xac e sinais ambientais, estas recentes descobertas, somadas à relação entre ZapA^{Xac} com uma proteína PAS poderia ser utilizada como base para estudos futuros que busquem compreender como a luminosidade afeta esta bactéria e como esta percepção se relaciona com a regulação da formação do septo.

Vale ressaltar que, embora não formem um operon, XAC0611, ao lado de XAC0610, é uma proteína relacionada à quimiotaxia. Ela foi pega juntamente com XAC4154 (FliY) em experimento de duplo híbrido realizado a partir de XAC1093 (hipotética) (DOCENA, 2006). Nesta mesma região, notamos XAC0614, uma proteína com domínio GGDEF e cujo homólogo em XCC é responsivo a XAC1933 (FliA) (YANG et al., 2009). Estes resultados em conjunto, sugerem que XAC0611 possa estar envolvida na transmissão de sinais endógenos que atuem na regulação da síntese flagelar.

3.3.2 Interação com o ambiente e destoxificação: XAC2529 (RhsD), XAC1136 (PrpR) e XAC4352 (Gst)

XAC 2529, que codifica para a proteína RhsD foi o terceiro fator mais representado nesta avaliação, com 18 presas identificadas. Ela leva este nome por conter repeats *rhs*, os quais foram primeiramente identificados em *E. coli* e nomeados por serem, devido às suas repetições quase idênticas, *hot spots* para recombinações homólogas (Rearrangement hot spot) (LIN et al., 1984). Hoje já se sabe que tais eventos não são tão expressivos quanto se imaginava, não havendo neles relevância para as diversas funções que as Rhs desempenham nas células (KUNG et al., 2012).

Proteínas que carregam *rhs* são encontradas entre Gram-negativas e Gram-positivas de maneira geral, estando presentes até mesmo em fungos e vertebrados. Distribuição com tamanha amplitude pode ser entendida como um forte indício de relevância biológica, suspeita corroborada pela existência de seleção positiva dessas proteínas em *E. coli* e *Shigella flexneri* (PETERSEN et al., 2007)

Interessantemente, *Xac* apresenta duas proteínas anotadas como RhsD: XAC3245 e XAC2529. Apenas a segunda foi encontrada como presa de ZapA^{Xac}, o que aponta para uma possível diferença no rol de atividades que cada uma delas exerce nesta bactéria. Embora para XAC2529 não existam dados a respeito de sua possível função, ensaios de disrupção de XAC3245 mostraram seu envolvimento em vias relacionadas à virulência (LAIA et al., 2009). Além disso, um levantamento comparativo realizado entre os genomas de *Xanthomonas* causadoras de cancrose em citros mostrou que XAC3245 está presente somente em *Xac*, estando ausente nas cepas *XauB* e *XauC* (MOREIRA et al., 2010).

Apesar de serem muitas vezes produtos de transferência horizontal (como em *E. coli* (HILL et al., 1994)), este parece não ser o caso das cópias RhsD de *Xac*, já que nenhuma delas está delimitada nas ilhas genômicas já descritas para este organismo (CHEN, 2006).

O papel que tais proteínas exercem na bioquímica das células é amplo e diverso. Há registros de proteínas Rhs atuando na produção de bacteriocinas (SISTO et al., 2010), mobilidade (YOUDEIRIAN; HARTZELL, 2007), fator de virulência (KUNG et al., 2012), inibidores de crescimento (KOSKINIEMI et al., 2013), associando-se a proteínas de superfície (HILL et al., 1994) e atuando como adesinas (PRADHAN et al., 2012).

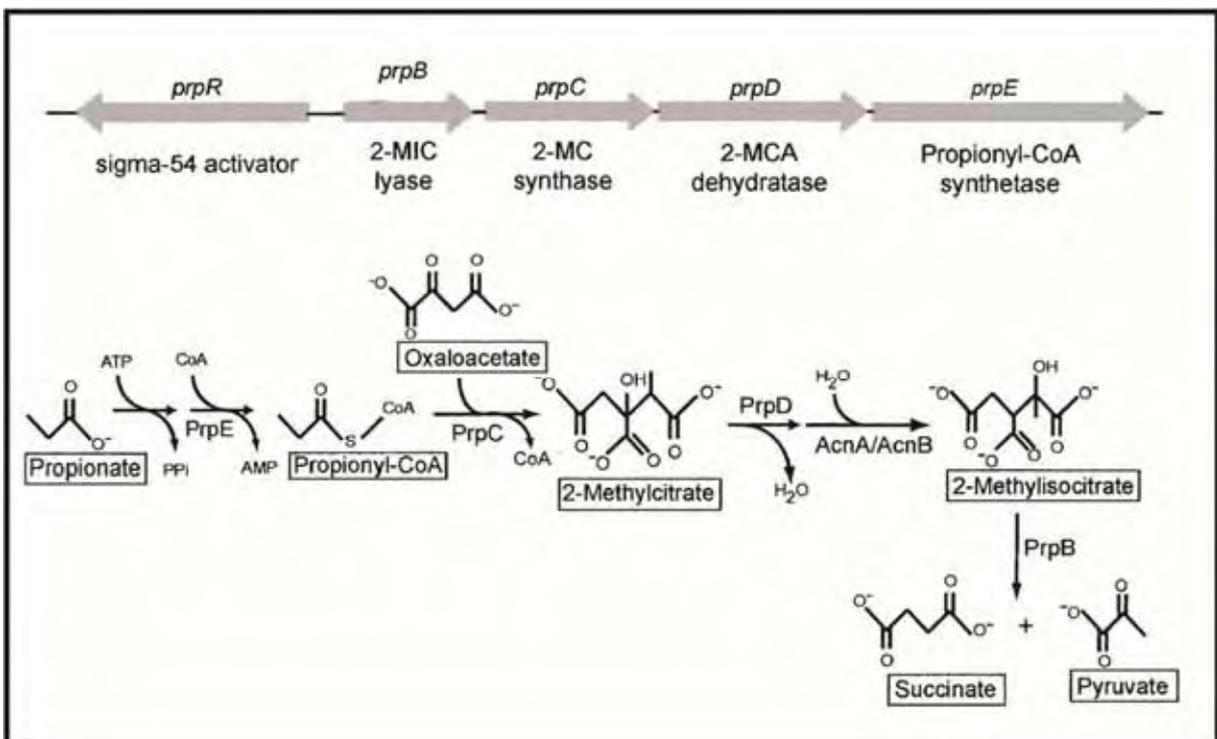
Dados recentes (PRADHAN et al., 2012) envolvem Rhs de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) como adesinas, o que de fato pode ser o caso de XAC2529. Em análise de localização subcelular pelo programa PSORTb esta proteína pareceu estar relacionada a membrana externa, e até mesmo possivelmente secretada, embora por via desconhecida, já que não apresenta nenhum peptídeo sinal.

Esta ORF também apareceu associada ao COG3209, cujo rol de proteínas envolve aquelas com localização extra-citoplasmática e relacionadas à síntese de membrana/parede celular. Tendo em vista o indício de relação com ZapA^{Xac}, aqui apresentado, futuros estudos poderão comprovar de maneira mais categórica a atuação desta RhsD no metabolismo do envelope celular de *Xac*.

Já **XAC1136** (PrpR) é uma proteína reguladora do metabolismo de propionato, um composto tóxico por ser capaz de interferir no ciclo TCA. Por este motivo, o propionato é utilizado como um aditivo na indústria alimentícia, atuando como inibidor do crescimento bacteriano. O produto de XAC1136 é uma proteína sensora do composto 2-metilcitrato, um intermediário da reação que converte o propionato a piruvato, resultando em destoxificação do meio e sua entrada como fonte de carbono.

Estudos em *Salmonella enterica* (PALACIOS; ESCALANTE-SEMERENA, 2004), mostraram que o ciclo deste operon é composto por *prpR*, e os componentes enzimáticos produzidos por *prpBCDEI*, além de uma aconitase (Figura 7). Em Xac este operon, no entanto, encontra-se incompleto. Há apenas a presença de *prpR*, *prpB* e *prpC*, não sendo encontrada em nenhum local do genoma proteína similar a *prpD* e *prpE*. Assim, não é possível determinar se este sistema é completamente funcional em Xac.

Figura 7: Esquema ilustrativo do operon catabólico do propionato em *Salmonella enterica*. Note a presença de todas os genes *prp* no operon, e sua atividade na degradação do propionato, demonstradas na parte inferior da imagem. Note que há a participação da enzima aconitase, cujo gene encontra-se fora deste operon (adaptado de PALACIOS; ESCALANTE-SEMERENA, 2004).



As glutationa-S-transferases, como **XAC4352**, estão presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos, embora praticamente ausentes dentre as gram-positivas (VERGAUWEN et al., 2003), onde nem a glutationa é encontrada ou internalizada.

Sua importância decorre da capacidade que tem a glutationa (γ -Glu-Cys-Gly) de atacar nucleofilicamente certos compostos, espontaneamente ou através das glutationa-S-transferases (Gst). Após esta transferência do tripeptídeo glutationa, o composto - antes tóxico – poderá ser degradado de forma inócua ou ter sua saída forçada através de bombas de ATP (SMIRNOVA; OKTYABRSKY, 2005)

É interessante o fato de que geralmente estas proteínas encontram-se super representadas nos genomas das gram-negativas, como em *E. coli* (nove genes) (SMIRNOVA et al., 2005), *Pseudomonas* (dez genes) (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002) e o mesmo ocorre em *Xac*, onde onze cópias estão dispersas ao longo de seu cromossomo. Podemos entender tal abundância como um indício do diverso rol de atividades nos quais estas proteínas estão envolvidas, assim como de sua imensa importância na manutenção da viabilidade celular.

A função específica de XAC4352 ainda permanece desconhecida, não sendo possível nem inferi-la com base em seu contexto genômico, já que geralmente as Gst encontram-se em operons específicos relacionadas às vias de detoxificação nas quais atuam (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002).

3.3.3 Metabolismo de aminoácidos: XAC2985 (GabP), XAC1653 (SerS) e XAC0631 (PtrB)

O produto de **XAC2985** está relacionado ao transporte de aminoácidos, sendo uma proteína integral de membrana – o que pode explicar sua possível interação com ZapA^{Xac}. GabP é uma permease capaz de internalizar o composto GABA (γ -amino-butirato), uma fonte de não-protéica de nitrogênio. Sabe-se que, para *Pseudomonas syringae*, esta fonte é utilizada preferencialmente em condições de depleção deste elemento, como no apoplasto das plantas, e por isso acaba atuando também como um mensageiro, inibindo o fenótipo virulento quando em excesso no meio de cultura (YU et al., 2013).

Aparentemente *Xac* apresenta apenas dois dos genes requeridos para o processamento de GABA (*gabD* e *gabP*), não estando presentes em um operon

como é o caso de *gabDTP* de *E. coli* (METZNER et al., 2004) (SCHNEIDER et al., 2002). Não sabemos, portanto, se ela é de fato capaz de completar o processamento desta fonte não protéica de nitrogênio em seu interior. Infelizmente, para Xac nenhuma possível relação entre sua função atribuída parece ter envolvimento direto com o divissomo ou com qualquer outra proteína a ele associada.

XAC1653 é a enzima envolvida na síntese do tRNA do aminoácido serina, estando seu gene presente em cópia única no genoma de Xac. Uma interessante conexão entre este aminoácido e a síntese de parede celular foi observada em *E. coli*. Aparentemente o excesso de L-serina compete com outro aminoácido, a L-alanina, durante a formação do pentapeptídeo utilizado para interconectar as cadeias de peptidoglicano da parede celular (ZHANG et al., 2010). A incorporação de L-serina ao invés de L-Alanina acaba por enfraquecer a parede celular nascente ocasionando, em última instância, a lise. Em *E. coli* este problema é contornado de forma a reduzir a concentração interna deste aminoácido, através do uso de desaminases que eliminam este excesso em momentos inoportunos do ciclo celular. Tendo em vista a interação entre ZapA^{Xac} e SerS, poderia ser que, de alguma maneira, Xac poderia estar utilizando o sequestro de SerS como estratégia para controle da quantidade de L-serina livre no interior celular em determinados momentos do ciclo celular.

XAC0631 codifica uma “prolyl oligopeptidase” (pfam326). Estas proteases clivam peptídeos de até trinta resíduos na porção c-terminal dos resíduos de lisina e arginina e estão ubiqüitadamente distribuídas dentre as bactérias gram-negativas, eucariotos unicelulares e até mesmo em humanos (POLGAR, 2002).

No protozoário *Trypanossoma cruzi*, a oligopeptidase B parece atuar como um fator de virulência (CALER et al., 1998), sendo um alvo de substâncias antimicrobianas. No entanto, pouco se sabe a respeito de sua função em bactérias, com poucos dados indicando apenas que sua ausência não é deletéria em *Salmonella typhimurium* (HEIMAN; MILLER, 1978).

3.3.4 Regulação bioquímica e estrutural: XAC0360 (GlpD), XAC0361 (GlpR), XAC1716 (PyrG), XAC1176 (SrfJ), XAC2273 (hipotética) e XAC2273 (hipotética)

As ORFs **XAC0361** e **XAC0360** fazem parte da mesma via bioquímica, relacionada à biossíntese e catabolismo de glicerol-3-fosfato (G3P). Um dos destinos do G3P é sua conversão em fosfolípidos, moléculas estruturais essenciais à formação das membranas plasmáticas.

Para a levedura *Debaryomyces hansenii* o glicerol exerce importante papel na manutenção do turgor celular e é interessante o fato de que a sinalização para sua síntese dependa diretamente da presença da parede celular. Isto se comprova pela incapacidade de protoplastos aumentarem a concentração interna deste composto, indicando uma via de sinalização dependente de sensores diretamente ligados a esta estrutura (THOME, 2007).

Para bactérias, existem poucos trabalhos que relacionem de maneira contundente a síntese de parede celular e/ou septação com o metabolismo de glicerol. Trabalhos antigos indicam que exista envolvimento entre o acúmulo de G3P e perturbação da septação/esporeação em *Bacillus subtilis* (O et al., 1973). Os autores demonstram que em mutantes onde ocorre acúmulo de G3P (mas não de glicerol), a esporulação é seriamente afetada, devido à sua deficiência na formação de septo o qual, quando se forma, é mais espesso que o normal, impedindo o amadurecimento do esporo. Embora este estudos não tenham tido prosseguimento, pode ser que haja alguma relação entre o fenótipo observado nestes mutantes e o fato de ZapA^{Xac} interagir com este sistema, o qual parece ter relação direta na formação de septo em algumas bactérias.

O produto de **XAC1716** (CTP sintetase) é o responsável, nas células procarióticas, pela síntese do nucleotídeo CTP a partir do precursor UTP. Das muitas funções que exercem, é notável que o CTP, ao menos em *Saccharomyces cerevisiae* esteja envolvido na síntese de todos os fosfolípidos que compõem sua membrana plasmática, processo regulado por proteínas relacionadas à manutenção da parede celular (CHANG; CARMAN, 2008). A interação de ZapA^{Xac} com a CTP sintase em Xac poderia ser explicada como decorrente de um mecanismo regulatório similar ao de *Saccharomyces*.

No entanto, recentes descobertas colocam a CTP sintase no rol das proteínas que constituem o citoesqueleto, e não só em bactérias, mas também em eucariotos superiores.

É crescente a noção de que muitas enzimas são capazes de se auto-associar, formando grandes estruturas no citoplasma, visão corroborada por estudos high-throughput de localização sub-celular de proteínas de leveduras. A CTP sintase de leveduras (Ura7p) associa-se espontaneamente em pequenos filamentos distribuídos ao longo do citoplasma, formação que independe de aumentos em sua taxa de expressão, mas mostra relação inversamente proporcional ao estado de saturação do meio: quanto menor a concentração de nutrientes, maior a quantidade de filamentos. Aparentemente, esta interconexão está diretamente relacionada ao estado energético da célula, e não à presença ou ausência de metabólitos específicos (NOREE et al., 2010).

É surpreendente que este perfil de filamentação da CTP sintase permaneça inalterado em espécies evolutivamente distantes, como em algumas células de *Drosophila melanogaster*, tanto em seu embrião como no organismo adulto (NOREE et al., 2010).

Em *Caulobacter crescentus*, a CTP sintase (CtpS) interage com a crescentina, auxiliando na regulação da forma celular de maneira independente de sua atividade catalítica. A CTP sintase nativa de *E. coli* (PyrG) também é capaz de filamentar tanto *in vitro* quanto *in vivo* (INGERSON-MAHAR et al., 2010), mostrando que a capacidade de polimerização linear desta enzima é de fato muito conservada entre os organismos até o momento avaliados.

Tendo em vista este enorme respaldo na literatura, de que esta enzima realmente é capaz de formar filamentos indistintamente do organismo no qual esteja inserida, sua possível interação com ZapA^{Xac} pode dever-se a este fenótipo. Sendo ela uma enzima com função metabólica indiscutível, principalmente no que diz respeito à síntese de fosfolípidos – elementos de grande importância durante a divisão celular – pode estar nesta atividade bioquímica sua importância para a septação – e associação com ZapA^{Xac}. Neste caso, existe a possibilidade de que seu fenótipo estrutural seja o facilitador que propicia a interação entre o septo e sua atividade enzimática essencial à bactéria.

Já as glicosil-hidrolases, de maneira geral, são enzimas capazes de hidrolisar uma ligação entre dois ou mais carboidratos. **XAC1176** (SrfJ) apresenta domínio

conservado O-glycosyl-hydrolase família 30 (GH30), compreendido no cluster COG5520, de proteínas envolvidas com a biogênese de envelope celular, conforme a própria descrição de seu domínio.

As SrfJ são consideradas um fator de virulência para diversos patógenos, inclusive humanos. O homólogo da proteína SrfJ de Xac em *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium já teve inclusive sua estrutura cristalográfica determinada (KIM et al., 2009), embora seu papel na biologia desta bactéria ainda permaneça incerto.

Sua função, seja como efetora ou não, parece estar de fato relacionada à sua atividade catalítica, capaz de desestabilizar membranas. SrfJ é capaz de produzir ceramida, um composto que altera as características físicas das biomembranas, formando domínios ricos neste lipídeo. Estas estruturas acabam por alterar a percepção de sinais de maneira generalizada, o que ocorre naturalmente e é evento responsável, por exemplo, por diferenciações, divisão celular e até mesmo apoptose (MINAMINO et al., 2003). (CORDERO-ALBA et al., 2012).

Além do mais, já se comprovou que as estruturas supra-moleculares originadas pelo auto-agrupamento de ceramidas nas membranas plasmáticas (“rafts”) é utilizada por muitas bactérias – e até mesmo príons – como porta de entrada para o interior da célula eucariótica (GRASSME et al., 2003) (GULBINS; LI, 2006).

A identificação destes compostos em bactérias é mais recente, tendo sido pela primeira vez detectado na membrana interna de bactérias pertencentes a um gênero próximo a *Pseudomonas*, o qual foi denominado *Sphingobacterium*. Recentemente, foi demonstrado que ceramidas bacterianas podem induzir apoptose em células humanas, podendo ser este um indício de que sejam fatores de virulência, embora fosse necessária a ruptura da célula para sua liberação (MINAMINO et al., 2003).

XAC2273 aparece como pertencente à superfamília DUF904 na base de dados Conserved Domains. Interessantemente, este grupo, embora esteja designado como de função desconhecida DUF904, é um domínio conservado que hoje já tem proteínas conhecidas como ZapB (descrito em *E. coli*), a qual interage diretamente com ZapA (EBERSBACH et al., 2008). Embora a identidade entre os resíduos de aminoácidos não seja completa, esta semelhança poderia ser a responsável pela afinidade do produto desta ORF por ZapA^{Xac}, observada neste experimento de duplo-híbrido. No entanto, as três cópias de XAC2273 obtidas como

presas tiveram seus peptídeos iniciados a partir do resíduo 132, enquanto este domínio termina no resíduo 107 da proteína. Assim, apesar de uma aparente relação direta entre esta proteína e o funcionamento do septo, este domínio não foi o responsável por esta interação.

A relação entre XAC2273 e ZapA^{Xac} ainda é incerta. No entanto, a presença de domínios que indicam ser XAC2273 uma proteína de membrana e/ou secretada (PSORTb), além de sua possível interação com funções relacionadas ao citoesqueleto podem elucidar esta interação. A base de dados KEGG aponta para a presença de domínio conservado pfam10473 o qual, embora se sobreponha ao DUF904, sugere que, de fato, esta proteína possa ter envolvimento em funções estruturais ou que, pelo menos, faça uso destas interações como fonte informativa para exercer outras atividades.

4 CAPÍTULO II: ANÁLISE GLOBAL DO PERFIL DE EXPRESSÃO EM XAC NA PRESENÇA DE CÓPIAS EXTRAS DE ZapA^{Xac}

4.1 Introdução

Em soma aos resultados obtidos pelos ensaios de interação protéica descritos no Capítulo I, realizamos uma análise do impacto da superexpressão no perfil global de proteínas expressas pelo mutante *Xac amy::pPM2a-zapA*.

A fim de que fosse minimizado o efeito interferente das proteínas plasmidiais, esta comparação foi efetuada a partir do mutante *Xac amy::pPM2a*, sendo que a proteína expressa pelo mutante em estudo é GFP-ZapA e a do mutante “controle” apenas GFP. Maiores detalhes acerca destes mutantes podem ser consultados em MARTINS (2010).

Muitas informações relevantes podem ser obtidas em estudos proteômicos que utilizam mutantes capazes de superexpressar proteínas alvo. A principal justificativa para esta abordagem é que, devido ao estrito controle transcricional que os organismos apresentam, a perturbação do balanço protéico de uma proteína pode desvendar seus mecanismos de regulação, assim como seu envolvimento em vias bioquímicas ainda desconhecidas.

Alguns estudos apontam grande variabilidade na quantidade de ZapA livre intracelular nas bactérias. Por exemplo, a proporção de ZapA com relação à FtsZ em *Bacillus subtilis* é de somente 5 % (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002), enquanto em *Escherichia coli* ela chega à razão de equimolaridade (MOHAMMADI et al., 2009). Nenhum dado existe para *Xac*, tampouco podemos quantificar o quão mais expressa está a proteína GFP-ZapA no mutante *Xac amy::pPM2a-zapA*, com relação à taxa normal do promotor nativo de ZapA^{Xac}.

Além do mais, nosso interesse no estudo deste mutante recai sobretudo em seu fenótipo de perda de virulência observado quando da sua construção (MARTINS et al., 2010), já que não há relatos de que a simples superexpressão de uma proteína divisional pudesse desestruturar de maneira tão importante as vias relacionadas a patogenicidade.

No entanto, a construção de réplicas do mutante *Xac amy::pPM2a-zapA* (a partir da transformação do plasmídeo *pPM2a-zapA* em linhagens de *Xac* selvagem)

resultou na manutenção do fenótipo virulento *in planta*, sugerindo a existência de mutações não-detectadas no mutante utilizado por Martins (2010) através de ensaios de triagem usuais realizados.

Tais alterações, acreditamos, devem ser a origem da perda de virulência observada no primeiro mutante construído. Da mesma maneira, mutantes Xac carregando pequenas deleções na porção N-terminal de ZapA^{Xac} também eram fenotipicamente idênticos à linhagem selvagem quanto à sua virulência (dados não mostrados), corroborando a hipótese de que ZapA^{Xac} não deve ter qualquer envolvimento na perturbação do fenótipo virulento em Xac.

Vele ressaltar que, inicialmente, o uso desta técnica no presente estudo intencionava realizar análise do perfil de expressão em mutante Xac com deleção do gene ZapA^{Xac}. No entanto, mesmo após inúmeras tentativas, a clonagem dos fragmentos necessários à construção desta linhagem foi infrutífera, o que nos levou a utilizar o mutante Xac *amy::pPM2a-zapA* que já dispúnhamos.

Não está descartada, portanto, a possibilidade de que os resultados obtidos se devam a interferências decorrentes desta mutação não identificada. Ainda assim, os dados destes experimentos são mostrados neste capítulo com o intuito de que possam sustentar algumas das interações identificadas anteriormente pelo experimento de duplo-híbrido (Capítulo I), contribuindo para sua validação.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Linhagens de Xac e cultivo

As linhagens de Xac utilizadas foram Xac *amy::pPM2a* e Xac *amy::pPM2a-zapA*, e maiores detalhes a respeito de sua construção estão em Martins (2010).

Para o crescimento celular, as linhagens foram crescidas a 30 °C 200 rpm em 50 mL de meio LB até que atingissem DO~1. Neste momento todo o volume foi centrifugado a 4.000xg durante 10 min, e o *pellet* gentilmente ressuspenso em 50 mL do meio indutor XVM2 (20 mM NaCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 0.16 mM KH₂PO₄, 0.32 mM K₂HPO₄, 0.01 mM FeSO₄, 10 mM frutose, 10 mM sacarose, 0.03 % Casamino Acids) (WENGELNIK; BONAS, 1996), voltando para o *shaker* nas mesmas condições iniciais por mais 30 minutos. Ao final deste tempo as células foram coletadas por centrifugação e congeladas para extração protéica no dia seguinte.

4.2.2 Extração de proteínas

O *pellet* foi suspenso em solução salina tamponada (K₂PO₄ 1,24 g/L; KH₂PO₄ 0,39 g/L; NaCl 8,8 g/L – pH7,2) e lavada uma vez nesta solução e ressuspenso em 750µl de tampão de extração (0,7 M sacarose; 0,5 M Tris, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0,1 M KCl e 40 mM DTT adicionados no momento do uso). Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, igual volume de fenol (saturado com HCL pH8) foi adicionado e o tubo foi submetido a vigorosa agitação por aproximadamente 15 minutos, sendo em seguida centrifugado 7000rpm durante 10min. O mesmo procedimento foi repetido por duas vezes com a fase superior da mistura, mas sem a adição do DTT no tampão.

Após o último procedimento, as proteínas foram precipitadas pela adição de 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol e incubadas overnight a -20°C. Após este período, os tubos foram centrifugados a 7000rpm/15min e o *pellet* lavado em solução de acetona 80 % gelada. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente e

solubilizado na solução de ressuspensão (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4 % CHAPS) e estocados a -20 °C até sua utilização.

4.2.3 Isoeletrofocalização, eletroforese bidimensional e análise dos géis

Todo o procedimento descrito neste item foi realizado no laboratório da prof. M.T. Marques Novo Mansur (DGE, UFSCar), que gentilmente cedeu equipamentos, reagentes, além de todos os protocolos aqui explicitados, por intermédio de sua aluna C. M. Carnielli que auxiliou na realização de todos os experimentos.

O extrato protéico foi purificado através do kit 2D Clean Up (GE Healthcare) para volumes de amostra contendo 260 µg de proteínas (de 1 a 100 µL), conforme protocolo descrito pelo fabricante. As amostras foram então dissolvidas em 199 µL de tampão de lise (7 M uréia, 2M tiouréia, 4 % CHAPS) e foram adicionados à solução 1,25 µL de IPG buffer pH 3 a 10 (0,5%) e 50 µL de DeStreak™ rehydration solution (GE Healthcare), totalizando um volume final de 250 µL.

Para a realização da Isoeletrofocalização (IEF) foram utilizadas tiras de IPG (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare) pH variando de 3 a 10. Todo o volume de 250 µL obtido após a purificação foi colocado na bandeja de reidratação (GE Healthcare) e as tiras depositadas *overnight* sobre as amostras forma que este estivesse em contato com a solução, permitindo sua reidratação. A primeira dimensão, que consiste na focalização isoelétrica, foi realizada no sistema Ettan™ IPGphor 3 (GE Healthcare) segundo a tabela 1:

Tabela 1: passos utilizados no programa de isoeletrofocalização das proteínas extraídas

Modo	Voltagem (V)	Voltagem/hora ou tempo (h)
<i>Step</i>	100 V	11h
<i>Step</i>	500 V	500 Vh
<i>Grad</i>	1000 V	800 Vh
<i>Grad</i>	8000 V	11300 Vh
<i>Step</i>	8000 V	2900 Vh
<i>Step</i>	100 V	10h

Para a realização da separação pela segunda dimensão as tiras foram incubadas sob agitação por 15 minutos em 3 mL de solução de equilíbrio (5,8 M

uréia; 0,06 M SDS; 0,12 M Tris pH 8,8 e 30 % glicerol, com traços de Bromophenol Blue) contendo 10 mg/mL de DTT. Em seguida, a solução foi descartada e substituída por 3 mL da mesma solução de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodoacetamida, e novamente agitadas durante a incubação de 15 minutos. Após este tempo, a solução foi retirada e as tiras lavadas em tampão de corrida (5 g/L Tris; 14,4 g/L glicina e 1 g/L SDS). As tiras foram então colocadas na parte superior do gel de poliacrilamida (concentração de 12,5 %). Para o padrão de peso molecular (Benchmark – Invitrogen), 10 µL foram depositados em papel de filtro (aprox. 1 cm x 1 cm) e após secagem do mesmo em estufa, foi encaixado no gel próximo ao lado positivo da tira de IPG. O gel de poliacrilamida foi selado com solução de agarose 1% contendo traços de Bromophenol Blue e a corrida da segunda dimensão foi realizada em sistema Hoefer™ SE600 (GE Healthcare), aplicando-se 45 mA por gel, sendo interrompida a eletroforese quando a frente de corrida atingiu a parte inferior do gel de poliacrilamida.

O gel foi então corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e documentado com o Image Scanner III (GE Healthcare), utilizando-se o software LabScan 6.0, com resolução de 300 dpi, Green filter e modo transparente. O ponto isoelétrico, a massa molecular e a intensidade (% de volume) aproximada de cada spot foi determinada pelo Software ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). As proteínas que foram identificadas com expressão diferencial significativa pelo teste ANOVA ($p < 0,05$), realizado pelo software ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare) foram selecionadas com base em sua intensidade e cerca de metade dos 120 spots foram manualmente isolados do gel para análise por espectrometria de massas.

4.2.4 Espectrometria de massas

Utilizamos nesta etapa o serviço prestado pelo Lab. Max Feffer coordenado pelo prof. Dr. Carlos Alberto Labate (ESALQ, Piracicaba-SP).

Os spots recortados foram levados ao laboratório supracitado e submetidos a purificação e tripsinização *in gel*, seguindo-se a análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF da Absciex.

Conforme informações transmitidas pelo corpo técnico deste laboratório, o procedimento deu-se da seguinte maneira: 1uL de amostra dissolvida em 50% (v:v) Acetonitrila e 1 ul da matrix alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid foram aplicados na placa de MALDI para a análise. O modo de análise utilizado foi reflector positivo. O valor em Hertz no modo MS foi 400 hz e no modo MS/MS 1000 hz. A voltagem da fonte de ionização foi 3400 kvolts no modo MS e 4700 kvoltz no modo MS/MS, sendo aplicado 1000 shots/spectrum no modo MS e 2500 shots/ spectrum no modo MS/MS. A análise foi realizada em automático e a calibração foi realizada com padrão interno, CAL Mix1 (ABsciex). Usou-se o CID (Collision Induced Dissociation) como método para o experimento de MS/MS (fragmentação dos peptídeos).

O programa utilizado para obter os resultados da espectrometria foi o ABsciex Maldi Tof/Tof series explorer version 4.1.0, e o programa utilizado para fazer as análises dos conjuntos de dados foi o Protein Pilot Software, com o Mascot, com identificação realizada frente ao banco de dados do genoma de Xac, cedido pelas alunas do lab. da prof. Maria Teresa Marques Novo Mansur.

4.3 Resultados e Discussão

A análise diferencial da taxa de expressão de proteínas foi realizada conforme descrito em Material e Métodos com base na comparação entre as triplicatas dos géis correspondentes ao crescimento *in vitro* dos mutantes Xac *amy::pPM2a-zapA* e Xac *amy::pPM2a* (controle).

As imagens dos géis são apresentadas na figura 8, sendo os géis A, B e C correspondentes à linhagem controle e os géis na parte inferior na imagem (D, E e F) provenientes da extração de proteínas do mutante Xac *amy::pPM2a-zapA*. Os géis A e D foram considerados o gel “master”, que são os eleitos em cada tréplica para a comparação diferencial dos spots.

Todas as réplicas dos géis foram comparadas uma a uma com seu respectivo gel *master* para que se pudesse validar a triplicada. Foram gerados neste processo os gráficos de *scatter plots* atestando que os mesmos estão de acordo com parâmetros mínimos de reprodutibilidade (Figura 9).

Após a análise entre os géis obtidos com cada um dos mutantes, obtivemos aproximadamente 120 spots diferencialmente expressos e estatisticamente válidos (teste ANOVA <0,05). Destes, cerca de 60 foram recortados e enviados para análise por espectrometria de massas por MALDI (Lab. Max Feffer, ESALQ – Piracicaba). No entanto, apenas 7 destes spots obtiveram *scores* válidos (>49), limitando a análise deste experimento. Os dados das identificações destes spots estão discriminados no quadro 2 e as imagens dos mesmos em cada gel podem ser visualizadas na figura 10.

Figura 8: A triplicada dos géis obtidos para cada um dos mutantes está representada na imagem acima. Os géis A-C são provenientes do mutante controle e os géis D-F do mutante Xac amy::pPM2a-zapa. As indicações em vermelho apontam as MM do marcador e em verde a linha de isoeletrofocalização, conforme está apontado no primeiro gel superior a esquerda.

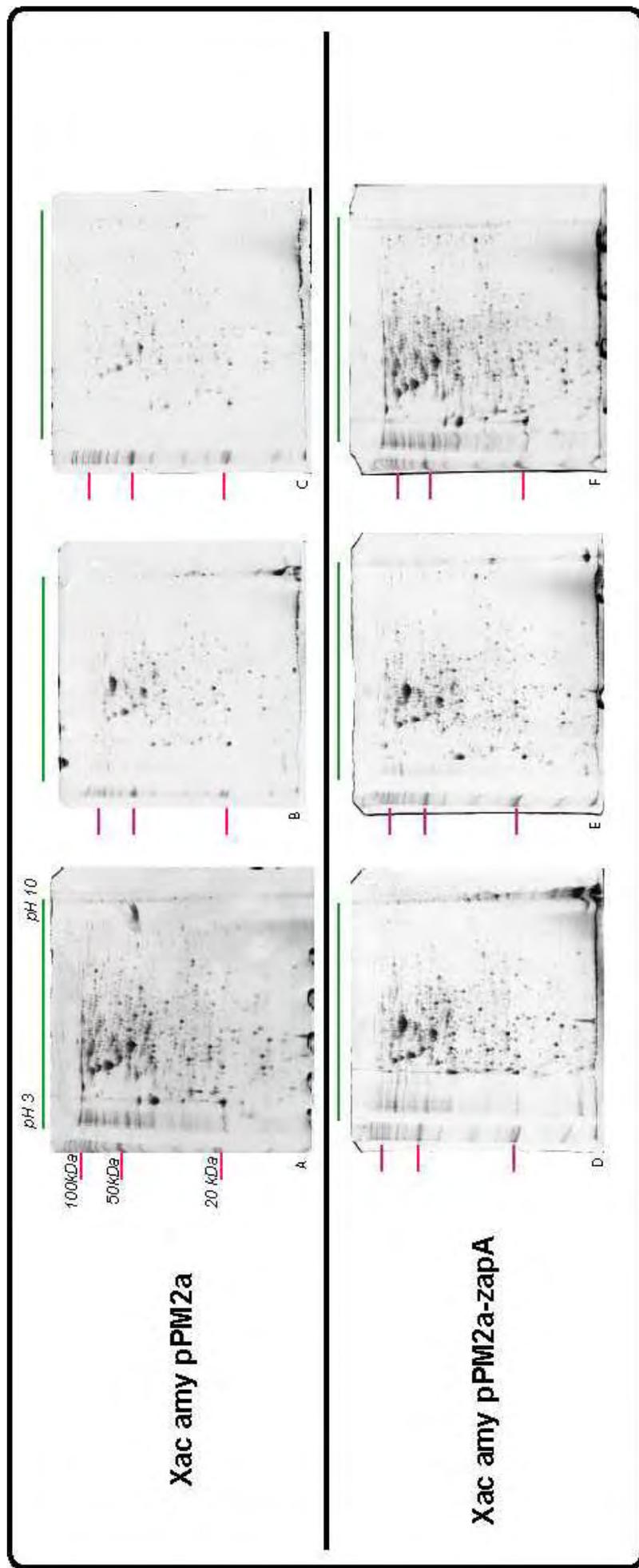
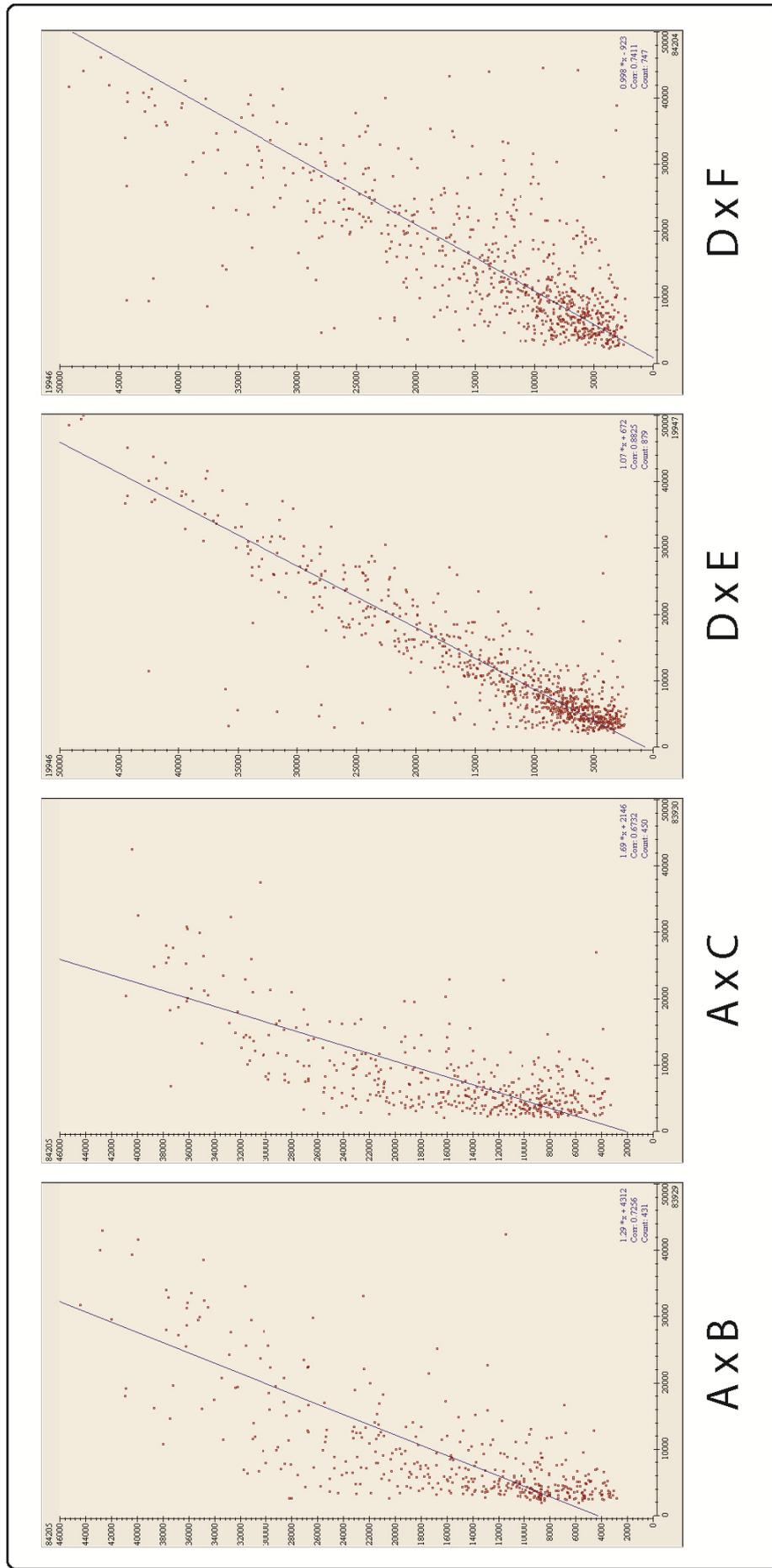


Figura 9: Scatter plot entre as réplicas dos géis A-F exibidos na figura 6. As letras abaixo indicam as réplicas que estão sendo comparadas com o gel máster de cada mutante



Quadro 2 : Resumo das proteínas observadas como diferencialmente expressas entre os mutantes *Xac amy::pPM2a* e *Xac amy::pPM2a-zapA*. As ORFs estão elencadas de modo crescente. Aquelas que encontram-se hachuradas foram mais representadas no mutante que superexpressa a proteína ZapA^{Xac}.

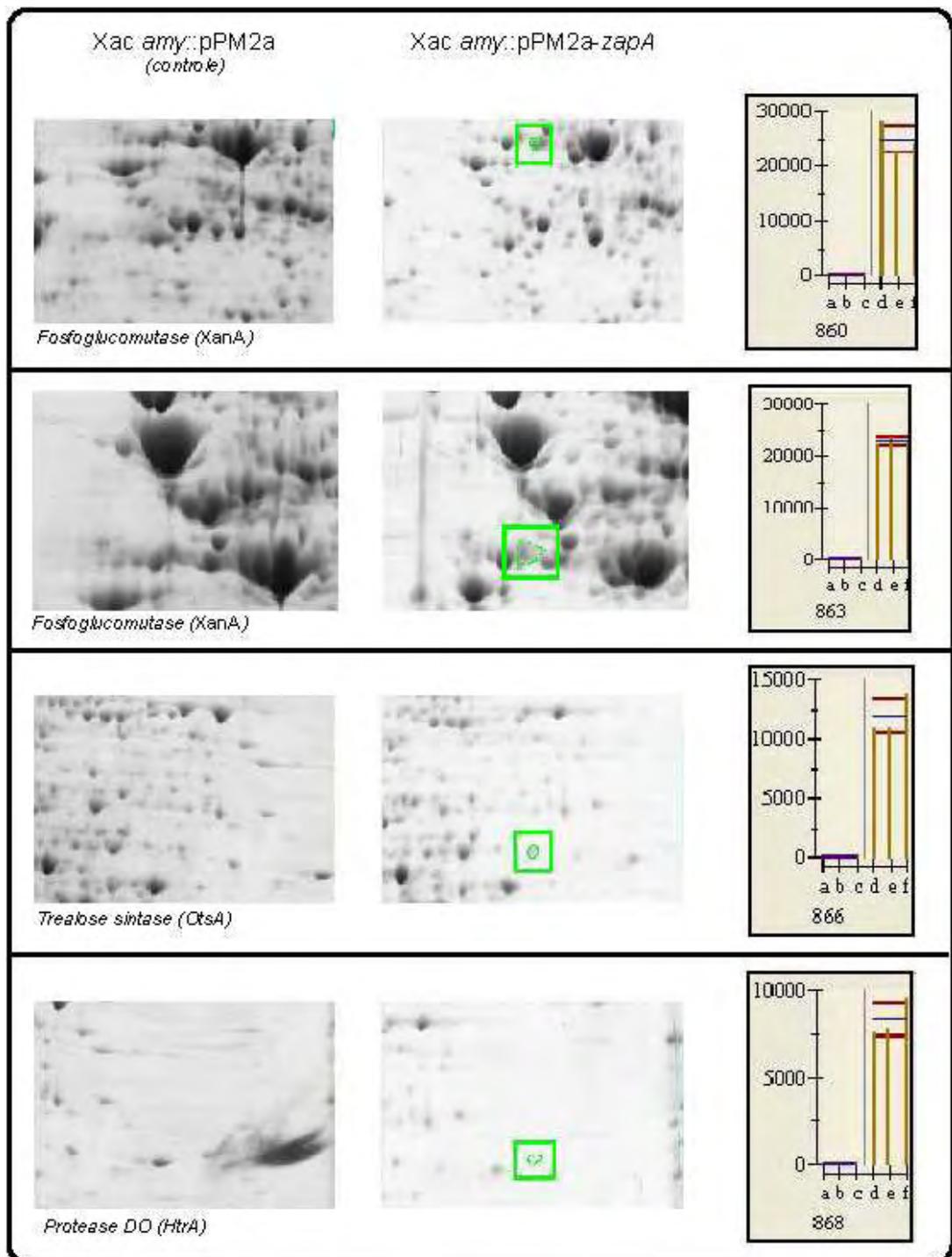
1-conforme dados do genoma disponíveis na base de dados NCBI;

2- preditos pelo programa pSORTb 3.0;

3-dados obtidos por espectrometria de massas/MASCOT

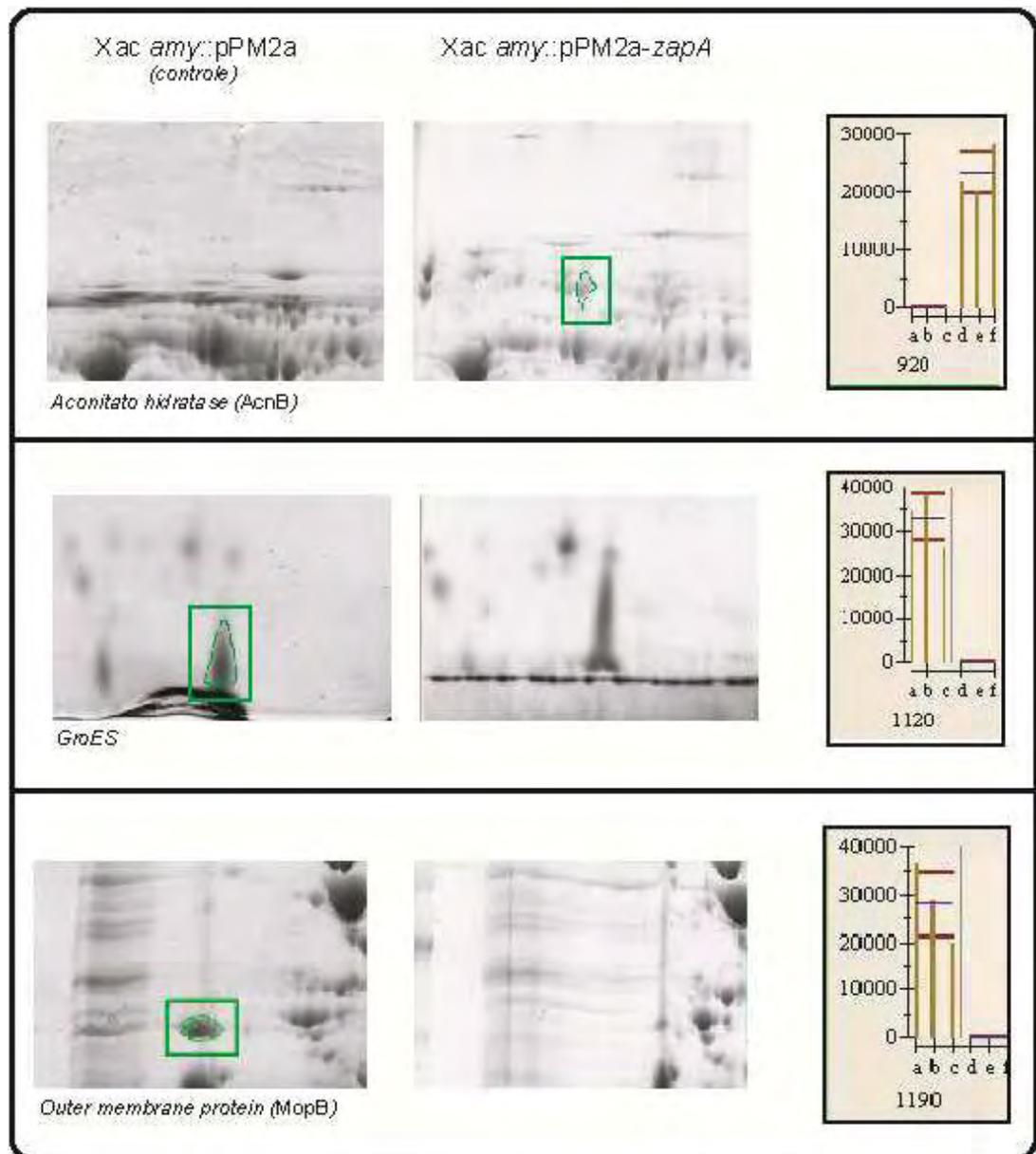
ORF (<i>spot nr</i>)	Proteína prevista ¹	MM/PI teórico ³	Score ³	Peptide match ³	Coverage ³	Categoria ¹	Localização teórica ²
<u>XAC0541</u> (1120)	Chaperonina 10kDa (GroES)	9.973/5,78	97	7	72%	Metabolismo de macromoléculas	Citoplasma
<u>XAC1012</u> (1190)	Outer membrane protein (MopB)	39.423/4,59	88	15	38%	Estrutura celular	Membrana externa
<u>XAC1885</u> (920)	Aconitato hidratase (AcnB)	92.846/5,22	61	8	8%	Metabolismo intermediário	Citoplasma
<u>XAC3211</u> (866)	Trealose-6-fosfato-sintase (OtsA)	50.781/6,71	50	8	17%	Patogenicidade, virulência e adaptação	Citoplasma
<u>XAC3579</u> (863) (660)	Fosfoglucomutase (XanA)	49.109/5,19	82	18	42%	Patogenicidade, virulência e adaptação	Múltipla (citoplasma/ periplasma)
			68	10	16%		
<u>XAC3980</u> (868)	Protease DO (HtrA)	49.934/7,96	85	11	22%	Metabolismo de macromoléculas	Periplasma

Figura 10: Visualização dos spots diferencialmente expressos entre os mutantes Xac em estudo. A primeira coluna apresenta imagens de gel obtido com o mutante controle (Xac *amy::pPM2a*), seguida pelas representações de gel proveniente do mutante Xac *amy::pPM2a-zapA* e os respectivos histogramas de comparação entre ambos. As proteínas superexpressas encontram-se circuladas em verde. As imagens comparativas foram obtidas pelo programa Image Master (GE). Note que os spots referentes à enzima fosfoglucomutase apresentam-se de maneira sequencial e que o de nº 863 está representado em maior aumento para melhor visualização.



Continua na página seguinte

Figura 10 (continuação)



A seguir descrevemos brevemente em que vias estas proteínas atuam e qual seria sua possível relação com a virulência e divisão celular de *Xac*.

4.3.1 XAC3579 – fosfoglucomutase (XanA)

A presença da fosfoglucomutase permeia um amplo espectro de organismos, sendo identificada em inúmeras espécies de bactérias e até mesmo em vertebrados mais derivados como seres humanos. Basicamente sua atividade é a de transferir grupos fosfato de moléculas de carboidratos, passando-os da posição 1' para 6' e vice versa.

Este mecanismo de ação pode ser uma explicação para o perfil apresentado por esta proteína nos géis 2D de *Xac*. Dois spots sequenciais foram identificados como XAC3579, tendo mesma massa, mas pI levemente alterados, o que pode ser explicado pela presença e ausência do grupo fosfato. Identificamos, portanto, dois intermediários de reação.

Em *Xanthomonas campestris*, a fosfoglucomutase ela é requerida para síntese de goma xantana (KOPLIN et al., 1992) e assim, existe grande possibilidade de que o mesmo ocorra para *Xac*. Ainda naquela bactéria, mutações visando sua depleção ocasionaram fenótipo de perda de adesão (HUNG et al., 2002), o que pode ser um efeito decorrente de problemas na síntese de goma. No entanto, sua presença em *Xanthomonas albilineans*, espécie desprovida deste exopolissacarídeo, levanta a possibilidade de que XanA de fato atue em outras vias bioquímicas (PIERETTI et al., 2012).

Por exemplo, seu papel na biogênese da parede celular já foi descrito para o gênero *Bacillus* (LAZAREVIC et al., 2005) e *Streptococcus* (BIZZINI et al., 2007) sendo possível que o mesmo ocorra em outros procariotos. A sua superexpressão no mutante *Xac amy::pPM2a-zapA* neste experimento pode ser um indício de que esta possa ser uma de suas atividades em *Xac*, já que o processo de septação está intimamente ligado à síntese de parede celular.

Os dados a respeito da regulação gênica de XAC3579 são controversos. A redução de sua expressão já foi detectada em meios indutores de patogenicidade (ASTUA-MONGE et al., 2005), mas o inverso também já está descrito (ZANDONADI,

2012) (ARTIER, 2010), inclusive em experimentos *in planta* após 3 dpi (FACINCANI, 2007).

Não há dados disponíveis que possibilitem encaixar XanA em vias regulatórias, nem mesmo relacionados a elementos sigma. Pode haver, no entanto, relação de sua atividade com a proteína RhsD identificada no ensaio de duplo-híbrido, já que ambas parecem atuar nas vias de adesão de *Xanthomonas* spp.

4.3.2 XAC3211 - Trealose sintase (OtsA)

A trealose sintase é uma enzima envolvida na síntese do dissacarídeo trealose, o qual está envolvido na sobrevivência da célula frente a diversas formas de estresse.

Em *E. coli* *otsA* foi mais transcrito em condições de choque térmico frio, juntamente com vias de síntese de outros açúcares (PHADTARE; INOUE, 2004), além de ser responsiva a RpoS, em meio M9 suplementado com glicose, não sendo observado este efeito em meio LB (WHITE-ZIEGLER et al., 2008) – o que sugere um envolvimento de seu uso em condições nutricionais específicas. Seu efeito protetor com relação a estresse frio já havia sido comprovado anteriormente (KANDROR et al., 2002), inclusive para outras bactérias como *Bradyrhizobium japonicum* (CYTRYN et al., 2007), onde foi detectado aumento nos transcritos de *otsA* frente a estresse dessecativo, havendo indícios de que este efeito protetor se deva à atuação da trealose nas biomembranas, estabilizando os grupos polares de proteínas nelas inseridas. Seu efeito vai além e atua também frente a estresses dessecativos o que já está descrito para várias espécies como *Chromobacterium salexigens* (REINA-BUENO et al., 2012).

Em Xac, dados já publicados mostram que o gene *otsA* apresenta-se mais expresso em condições que induzem a virulência. Ainda é incerto o exato papel no qual a trealose possa atuar, mas algumas hipóteses apontam a possibilidade de que esta seja uma forma de desviar o fluxo de carbonos da planta para o microrganismo ou de desestabilizar os sistemas de percepção de açúcares que a planta dispõe (ASTUA-MONGE et al., 2005). No entanto, seu efeito protetivo poderia estar sendo útil frente ao estresse decorrente do sistema de defesa da planta atuando sobre a

bactéria, já que dados *in planta* corroboram a elicitação da via da trealose de maneira crescente nos primeiros 5dpi (FACINCANI, 2007).

4.3.3 XAC0541 Chaperona GroES

As chaperonas são moléculas que exercem importante função no interior celular, atuando no correto enovelamento de mais de 250 proteínas de *E. coli* (KERNER et al., 2005), sendo nesta bactéria também induzida em situações de estresse como choques térmicos (PHADTARE; INOUE, 2004).

No entanto o operon *groESL*, pelo menos em algumas bactérias como *Caulobacter crescentus*, parece estar estreitamente relacionado ao momento do ciclo celular, já que seu nível de expressão aumenta no estágio pré-divisional (AVEDISSIAN, LOPES-GOMES, 1996). Nesta bactéria também há regulação dependente da fase do ciclo celular para o sistema das chaperonas DnaK/J¹ (GOMES et al., 1990). Tais indicações corroboram inúmeras evidências experimentais indicando que não apenas o estresse térmico produza substratos para a atuação destes elementos homeostáticos bacterianos, mas também as condições fisiológicas comuns (SUSIN et al., 2006).

De maneira similar, já foi observada estreita correlação entre GroES no encadeamento entre a duplicação do plasmídeo F com o ciclo celular de *E. coli*, havendo parada do processo de formação do septo quando o sistema GroE não está presente (MIKI et al., 1988). Além disso, GroE atua em elementos que interferem diretamente na síntese da parede celular em *E. coli* (MCLENNAN; MASTERS, 1998), sendo classificado como pertencente ao grupo das proteínas divisionais desta bactéria na base de dados ECOCYC.

Uma importante ligação entre GroE e os sistemas de divisão relaciona-se à dependência de FtsE ser propriamente conformada por este sistema de chaperonas, havendo decréscimo de FtsE na ausência de GroE (FUJIWARA TAGUCHI, 2007). Sua ausência acarreta problemas divisionais clássicos, como tantas outras deficiências de elementos septais: a filamentação.

¹ As ORFs correspondentes a DnaJ e DnaK supressor foram identificadas no experimento de 2D, mas devido ao score apresentado ser inferior ao determinado estatisticamente, não foram consideradas na elaboração deste capítulo.

Em Xac, sabe-se somente que GroEL, proteína associada a GroES, é diferencialmente expressa em meio indutor em comparação a meio de cultivo rico em nutrientes (ARTIER, 2010) e que esta expressão diferencial não é observada em outras bactérias causadoras de cancrose, mas somente em Xac (ZANDONADI, 2012).

O papel destas chaperonas nestas situações pode estar relacionado às ações impingidas sobre Xac, não pelo sistema de defesa do hospedeiro, já que tais observações se baseiam em resultados *in vitro*, mas por estresses que sejam relativos à condição nutricional do meio.

4.3.4 XAC3980 - Protease DO (HtrA)

Em gram-negativas, estas serino-proteases atuam na região periplásmica auxiliando na degradação de proteínas em via de serem secretadas e que estão mal-conformadas ou imprópriamente agregadas. Há também evidências englobando HtrA no rol de proteínas relacionadas à virulência de diversos agentes patogênicos. No entanto, por atuar em um processo central à manutenção do espaço periplásmico, tem sido sugerido que estas perturbações causadas na ausência de HtrA se devam sobretudo à um comprometimento da qualidade dos componentes protéicos desta região, devido ao acúmulo desordenado de agregados protéicos não-degradados. Isto se deve não só à sua atividade proteásica, mas também à sua atividade como chaperona, já que HtrA atua na conformação de algumas proteínas secretadas (LAIA et al., 2009; LYON; CAPARON, 2004).

Sua presença em diversas gram-positivas, bactérias sem o espaço periplásmico, também já foi confirmada, havendo evidências de sua atuação em vias secretórias de proteínas relacionadas à virulência em *Streptococcus pyogenes* (LYON; CAPARON, 2004) Além do mais, em *Streptococcus pneumoniae*, HtrA tem localização no septo e pólos das células, e não ao longo da membrana plasmática (TSUI et al., 2011), o que poderia sugerir seu envolvimento da manutenção e desenvolvimento desta estrutura.

Para Xac, são poucos os dados relativos a esta ORF. Mutantes de XAC3980 (LAIA et al., 2009), de maneira similar com o que já foi observado para outras bactérias, também apresentaram perda de virulência. Existem evidências também

de que haja uma interação entre HtrA e as proteínas XAC4263 (hipotética, sem domínios conservados), XAC3292 (Histidina-quinase) e XAC3975 (Histidina-quinase), sendo interessante ressaltar que estas duas sensoras também interagem com XAC1274, uma proteína híbrida histidina-quinase/regulador de resposta (DOCENA, 2006). Aparentemente esta rede de interações sugere o envolvimento de HtrA como uma proteína capaz de receber e/ou passar sinais que suscitem determinadas respostas celulares. Dada a natureza de sua atividade, estes sinais podem estar relacionados de maneira geral a estresses ambientais e/ou do envelope celular, como já foi descrito para *Listeria monocytogenes* (WILSON et al., 2006), e *Yersinia* spp. (HEUSIPP et al., 2004) (WILLIAMS et al., 2000).

4.3.5 XAC1012 – outer membrane protein (MopB)

Em *E. coli* OmpA é uma molécula muito representativa do perfil protéico exibido por esta bactéria em sua superfície, chegando a apresentar-se em até 100.000 cópias por célula (SMITH et al., 2007). Sua atividade já foi envolvida nas mais diversas vias, da conjugação à regulação osmótica. Ainda assim, atuando em tantas frentes, sua função estrutural é das mais importantes, auxiliando inclusive na fixação das membranas interna e externa do envelope celular (WANG, 2002).

Sendo um fator estrutural de membrana, quando experimentalmente induzida o resultado é fatal: seu excesso ocasiona estresse agudo do envelope celular, o que determina a lise. Por outro lado, sua ausência não é deletéria, mas revelou que OmpA estimula a expressão de CpxP, do sistema de dois componentes relacionado a estresses do envelope celular (MA; WOOD, 2009), levantando indícios acerca de sua atuação na rede de interações e de regulação dos sistemas envolvidos na manutenção desta estrutura.

A super-expressão desta proteína já foi identificada *E. coli* durante o estabelecimento de biofilmes (ORME et al., 2006), e sua repressão ligada ao sRNA MicA, o qual participa da rede de resposta ao σ^E . Este sistema de regulação recrutado por σ^E é relacionado, dentre outras muitas atividades, ao estresse do envelope, sendo este monitorado constantemente pela célula a partir do estado de conformação das Omp (JOHANSEN et al., 2008). Assim, imagina-se que vias de

resposta a estresse do envelope celular atuam diretamente na regulação da expressão/tradução de OmpA (SMITH et al., 2007).

Por ser uma proteína externa abundante e presente em todas as gram-negativas, seu reconhecimento pelo hospedeiro das bactérias patogênicas parece ser incontestável. A deleção de OmpA em linhagens de *E. coli* proporcionou melhor sobrevivência em tecidos cerebrais, sugerindo que ela seja reconhecida pelo sistema de defesa (WANG, 2002), o que já foi comprovado para *Rickettsia parkeri* (PORNWIROON et al., 2009). Além do mais, seu envolvimento com a virulência é claro: OmpA está relacionada no processo de adesão em *E. coli* (WEISER; GOTSCHLICH, 1991), sendo um fator importante neste processo.

O homólogo de XAC1012 em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) mostrou-se mais expresso na linhagem selvagem em uma comparação proteômica com uma linhagem depletada do gene *rpfF* e, portanto, incapaz de produzir o mensageiro DSF, relacionado ao *quorum-sensing* (QIAN et al., 2013). Este aumento indica um envolvimento desta proteína de membrana em resposta a estes sinais do ambiente, os quais são muito importantes como mensageiros das vias de virulência das *Xanthomonas* spp.

4.3.6 XAC1885 - Aconitase hidratase (Acn2)

A aconitase é uma enzima envolvida primariamente na conversão reversível do citrato a isocitrato no ciclo do ácido tricarboxílico/glioxilato.

Em Xac, sabe-se que a aconitase é reprimida *in planta* já nos estágios iniciais de infecção (LAIA, 2007), o que contrasta com o fenótipo de superexpressão observado no mutante Xac *amy::pPM2a-zapA* quando comparado com o mutante Xac *amy::pPM2a*.

Interessante ressaltar que as apo-aconitases, presentes quando a célula se encontra em ambiente depletado de ferro ou capaz de causar estresse oxidativo, passam a bloquear a tradução de determinados transcritos ou aumentam a estabilidade de outros com sua associação e tais mRNAs (BEINERT; KENNEDY, 1993; TANG; GUEST., 1999).

Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* uma aconitase codificada pelo gene *rpfA* (homólogo a XAC1882) mostrou-se relacionada ao controle da expressão

de exopolissacarídeos e é também sensível à disponibilidade de ferro (WILSON et al., 1998).

Já em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* observou-se que a transcrição do gene *acnB* (homólogo a XAC1885) ocorre de maneira conjunta a duas ORFs localizadas upstream, as quais também são homólogas às ORFs upstream de XAC1885 (XAC1883 e XAC1884) (KIRCHBERG et al., 2012), sugerindo que o mesmo perfil regulatório ocorra em Xac. Tais resultados também revelaram que sua expressão relaciona-se à etapa do ciclo celular, sendo mais representada na fase estacionária do que na exponencial, de maneira correlata com o que já foi descrito em *E. coli*. (BRADBURY et al., 1996).

5 CAPÍTULO III: ANÁLISE DOS MUTANTES NOCAUTE DO GENE ZapA^{Xac} E XAC3407

5.1 Introdução

Assim como a superexpressão, a depleção de proteínas também é de elevado valor na composição do rol de atividades no qual o componente celular em estudo atua na biologia do organismo.

Neste capítulo abordamos, ainda que de maneira incipiente, possíveis alterações de fenótipo apresentadas pelos mutantes *Xac zapA::TOPO-intzapA* (com disrupção do gene *zapA*), *Xac XAC3407::TOPO-int3407* (com disrupção da ORF XAC3407) e *Xac XAC3407-zapA::TOPO-intEXT* (com disrupção do operon composto por *zapA* e a ORF XAC3407).

XAC3407 foi uma das ORF mais representadas no estudo de duplo-híbrido realizado com o uso de ZapA^{Xac} como isca (Capítulo I). Até o momento ela está identificada como sendo uma proteína hipotética, com 73 aminoácidos e um domínio conservado TIGR02449. No entanto, seu contexto genômico, com localização justaposta a *zapA* sugere que, de fato, ambas possam ser expressas e/ou atuar conjuntamente.

Todas *Xanthomonas* sequenciadas e anotadas até o momento apresentam homólogos de *zapA* e XAC3407 neste exato posicionamento no genoma, sendo que o mesmo ocorre com algumas linhagens de *Xylella* spp., como *X. fastidiosa*. O papel desta proteína ainda é bastante incerto, mas os dados obtidos neste trabalho reforçam o fato de que XAC3407 atue de maneira direta na composição do septo de *Xanthomonas* spp., não havendo homólogos deste gene em Gram-negativas mais estudadas como *E. coli*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 PCR e clonagem dos fragmentos

Os procedimentos de PCR e clonagem seguem o que já foi descrito no item 3.2.1, mas com o uso da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas) e dos primers como segue:

- 1) Noc 3407 F (5' GGAGGCGTTGGTGGAGCG) e Noc 3407 R (5' GCTCGTTCTTGGTCAACAG) para produção do fragmento *noc3407*, referente ao gene *XAC3407*;
- 2) nocF (5' GTGAGCAACAACGAACCGGTCTGAAGCGTGCGTATTCTG) e nocR (5'TCAGCGCGGCAGCGGTGAGAC) para produção do fragmento referente ao gene *zapA* ;
- 3) os mesmos primers Noc 3407 F e nocR mencionados acima foram utilizados em combinação para produzir fragmento capaz de causar disrupção na ORF *XAC34-7-zapA*

Os fragmentos foram diretamente ligados no vetor TOPO-TA (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante e seqüenciados para confirmação de sua identidade. Este plasmídeo construído foi diretamente transformado em *Xac* para a disrupção dos genes em estudo.

5.2.2 Transformação de *Xac*

Este protocolo foi adaptado de seu original, gentilmente cedido pelo prof. S. C. Farah (IQ, USP São Paulo).

De placa de *Xac* com 48 horas de cultivo procedemos com o inóculo direto da massa celular em erlenmeyer contendo 100ml de meio CG (MP biomedical). Após crescimento overnight, as células foram centrifugadas (4000xg/10min) a 20°C, e o

pellet lavado por duas vezes em meio volume de água MiliQ estéril. Da última lavagem, as células foram ressuspensas no volume residual de água e imediatamente submetidas a eletrotransformação em cuvetas de 0,2cm e com aproximadamente 300ng de DNA (parâmetros: 2kV, 25µF e 200ohms). Após o choque a suspensão de células foi coletada com a adição de 900µl de meio 2xTY (1,6% triptona, 1% extrato de levedura e 0,5% de NaCl – pH7) e incubada em shaker por aproximadamente 2 horas, período ao qual ocorreu o plaqueamento de todo o volume (1ml) em meio N suplementado com kanamicina 20ug/ml

5.2.3 Teste de patogenicidade

Os testes foram realizados em plantas de laranja Natal em casa de vegetação localizada no campus da UNESP de Araraquara-SP. Utilizamos como controle a linhagem de Xac sequenciada (306) e os demais mutantes foram obtidos pela transformação (ver item 5.2.2) dos vetores construídos conforme descrito no item 5.2.1

As células foram crescidas em placas contendo meio N por aproximadamente 48h, quando foram coletadas e ressuspensas em tampão PBS1x, onde foram ajustadas até que a leitura de DO atingisse 0,4. Na sequência esta suspensão foi diluída 1000 vezes neste mesmo tampão, resultando em concentração de células de aproximadamente 10^5 células/ml.

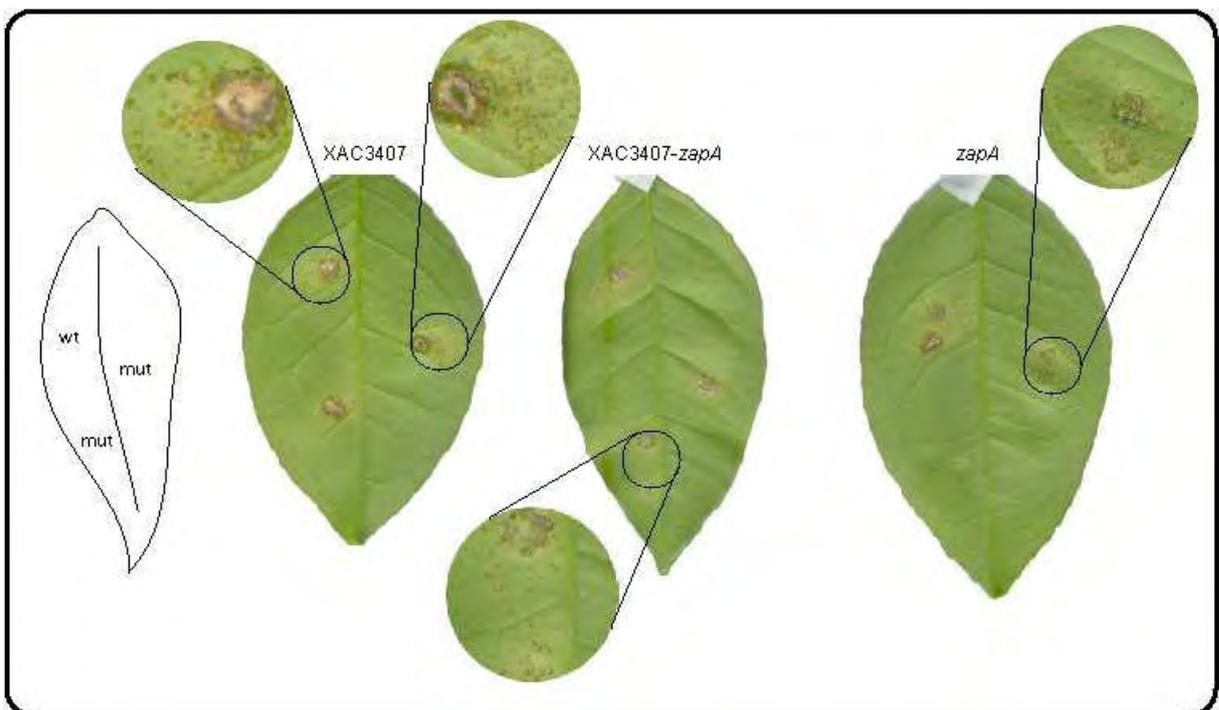
Para a infiltração da suspensão, as folhas foram superficialmente limpas com papel embebido em água e perfuradas nos locais onde as células seriam inoculadas. Em seguida, com o auxílio de uma seringa de 1ml a suspensão foi pressionada pelo ferimento, adentrando o mesófilo foliar. Os testes foram realizados em triplicata e as folhas mantidas em estufa por 3 semanas.

5.3 Resultados e Discussão

O principal objetivo do experimento de interrupção era avaliar o efeito desta perturbação no processo de infecção *in planta*, para melhor elucidar o fenótipo inicialmente apresentado pelo mutante *Xac amy::pPM2a-zapA* (MARTINS et al., 2010), de decréscimo em sua virulência.

Como pode ser observada na figura 11, nenhuma alteração foi detectada nos mutantes com produção alterada de ZapA, XAC3407 e do operon XAC3407-ZapA. Foram avaliados 2 mutantes para cada construção, em folhas de laranja da variedade Natal ao longo de 22 dias, sempre em comparação com o fenótipo apresentado pela linhagem selvagem. Vale ressaltar que tais dados estão de acordo com o que foi obtido previamente em mutantes portando deleções na porção N-terminal de ZapA no vetor pPM2a, os quais mostraram-se virulentos como a linhagem selvagem (dados não mostrados).

Figura 11: Imagens representativas dos testes de patogenicidade realizados em folhas de laranja Natal após 3 semanas da infiltração. As folhas são visualizadas em sua face abaxial, e a disposição dos mutantes segue o esquema à esquerda, sendo a linhagem selvagem sempre a superior, seguida por dois diferentes mutantes carregando interrupção no locus descrito acima de cada folha.



Embora com tais dados ainda não seja possível avaliar precisamente se as disrupções são capazes de perturbar aspectos mais básicos da biologia celular, como tamanho e perfil de crescimento da bactéria, aparentemente não há graves defeitos. Isto porque ao longo de todos os crescimentos realizados, tanto em meio líquido quanto sólido, não notamos qualquer atraso que caracterizasse um fenótipo deletério, como ocorre em mutantes de outros genes de *Xac*, como *parB* (Ucci, A. P. dados não publicados). Testes mais precisos como a curva de crescimento, acompanhada de medição dos comprimentos celulares deverão ser realizados no futuro para que se confirmem esta aparente normalidade.

Estes mutantes *Xac*, embora ainda precisem ser confirmados por experimentos de Southern Blot, apontam para a constatação de que ZapA^{Xac}, assim como o produto de XAC3407 não devam atuar de forma direta ou essencial na manutenção do fenótipo virulento de *Xac*.

A fim de que pudéssemos aferir a localização do produto de XAC3407 no interior da célula, ORF a qual dada sua interação com ZapA^{Xac} poderia seguir para o septo, construímos um vetor capaz de expressar tal proteína em fusão com GFP, da mesma forma que o vetor pPM2a-*zapA* (dados não mostrados). No entanto, mesmo após inúmeras tentativas, não foi possível a obtenção de mutantes de *Xac* viáveis, o que possibilitaria a visualização desta proteína hipotética no interior celular.

Embora não saibamos o real motivo deste insucesso, existe a possibilidade de que o excesso de proteína e/ou a presença da mesma com o tag GFP possam causar alguma perturbação que inviabilize o mutante.

Ainda assim, observamos - de maneira qualitativa apenas - que os clones de *E. coli* expressando a construção GFP-XAC3407 apresentavam-se mais alongados que o normal quando visualizados sob microscópio óptico. Este pode ser mais um indício de seu envolvimento na septação, onde o excesso desta proteína (ainda que inexistente em *E. coli*) foi capaz de provocar perturbação morfológica, provavelmente por sua interação com componentes como ZapA (dados não mostrados).

Sua localização em *Xac* será avaliada no futuro, para que possamos caracterizar XAC3407 de forma mais detalhada, comprovando ou não seu direcionamento para o septo e, talvez, elencando-a como uma nova classe proteínas envolvidas no divissomo.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados neste trabalho revelam uma faceta até então desconhecida acerca do sistema de divisão de Xac, e em alguns pontos, sugerem envolvimento de ZapA^{Xac} com componentes cuja associação é inédita até mesmo para outras bactérias.

Uma relação fortemente sugerida pelo experimento de duplo-híbrido é a de ZapA^{Xac} com proteínas reguladoras de flagelo, como FliA, FliY e, possivelmente, XAC0424 e XAC0610. Embora dados na literatura atestem a inter-relação entre a conclusão do septo e a biossíntese do flagelo, ZapA nunca foi mencionada como uma possível ponte entre tais vias, não havendo, conhecimento detalhado a respeito de como esta regulação ocorreria bioquimicamente.

O septo é, de certa forma, um “check-point” de parâmetros celulares que podem levar a célula a interromper o processo divisional caso algum problema seja detectado, como falhas na construção do flagelo. Outros problemas também devem ser detectados e sabe-se que, por exemplo, em *B. subtilis* o sistema de dois componentes CsrRS está primariamente localizado no septo (NOONE et al., 2012), sendo um sensor de estresse do envelope celular. Funcionalmente homólogo a este sistema são as proteínas CpxAR de *E. coli*, que exercem função semelhante nesta bactéria e são ativadas pelo acúmulo de proteínas periplásmicas mal-conformadas, havendo também relação com fenótipo virulento nesta e em outras gram-negativas (VOGT; RAIVIO, 2012).

Proteínas relacionadas a este tipo de estresse foram identificadas na comparação do perfil de expressão entre os mutantes (XanA, HtrA, OmpA), demonstrando que o excesso intracelular de ZapA^{Xac} pode ocasionar alguma perturbação na estruturação do envelope, embora não haja nenhuma alteração nas curvas de crescimento deste mutante (MARTINS et al., 2010)

A metabolização de alguns elementos também parece ter relação com a septação, o que indiretamente pode ter envolvimento com o estado nutricional da bactéria e fase de crescimento. Por exemplo, a interação de ZapA^{Xac} com PrpR, regulador do metabolismo de propionato, pode ser a origem do aumento no perfil de expressão da proteína Acn2 observado nos géis 2D do mutante com cópias extras de ZapA^{Xac}. Ambas Acn2 e PrpR estão relacionadas às mesmas vias bioquímicas

do interior celular, atuando inclusive como reguladores traducionais e responsivos à fase do ciclo celular. Pode haver, também, uma relação entre estas proteínas com componentes flagelares, mencionados anteriormente. Isso porque em *E. coli* a deleção do sistema QseBC (que envia sinais para FliA) ocasiona aumento na expressão de diversas vias metabólicas, como a do glioxilato (HADJIFRANGISKOU et al., 2011), onde as aconitases se também se inserem. Também pode haver relação entre esta percepção do estado nutricional e flagelo, por intermédio da XAC0610, devido ao perfil de seus domínios conservados e o envolvimento com componentes flagelares já citado acima.

A regulação entre flagelo, estresse do envelope e estado nutricional ainda deve ser melhor estudada, principalmente com relação ao seu envolvimento com os processos de virulência de Xac, já que muitas destas proteínas acabam indiretamente interferindo em seu crescimento *in planta*.

Em conjunto, os dados desta tese levantam inúmeras vias cuja relação com ZapA^{Xac} (e septo) pode fornecer importantes informações a respeito da biologia de Xac. Além disso, comprovamos pela análise de mutantes de interrupção de ZapA^{Xac} e de seu operon que não aparentemente não há relação direta entre ZapA^{Xac} e virulência nesta bactéria. Também detectamos pela primeira vez um possível novo componente formador de septo, XAC3407, uma proteína do operon de ZapA^{Xac} e com domínio cuja função ainda é desconhecida, e que pode ser brevemente classificada como pertencente ao crescente rol de proteínas atuando no divisso.

REFERÊNCIAS

- AARSMAN, M. E. et al. Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. **Mol Microbiol**, v. 55, n. 6, p. 1631-1645, 2005.
- ADAMS, D. W. ; ERRINGTON, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 9, p. 642-653, 2009.
- ADDINALL, S. et al. FtsZ ring formation in fts mutants. **J Bacteriol**, v. 178, n.13, p. 3877-3884, 1996.
- ALEGRIA, M. C. et al. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. **J Bacteriol**, v. 186, n.18, p. 6186-6197, 2004.
- ALEXEEVA, S. et al. Direct interactions of early and late assembling division proteins in *Escherichia coli* cells resolved by FRET. **Mol Microbiol**, v. 77, n. 2, p. 384-398, 2010.
- ARAVIND, L. ; PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 12, p. 458-459, 1997.
- ARTIER, J. **Análise proteômica diferencial da fração periplásmica de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* : proteínas relacionadas com a indução de patogenicidade *in vitro*** In *Departamento de Genética e Evolução* pp. 75. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2010
- ASTUA-MONGE, G. et al. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J Bacteriol**, v. 187, n. 3, p. 1201-1205, 2005.
- AVEDISSIAN, M. ; LOPES GOMES, S. Expression of the groESL operon is cell-cycle controlled in *Caulobacter crescentus*. **Mol Microbiol**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 1996.
- BARTEL, P. L. et al. A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. **Nat Genet**, v. 12, n. 1, p. 72-77, 1996.
- BEGG, K. J. ; DONACHIE, W. D. Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. **J Bacteriol**, v. 163, n. 2, p. 615-622, 1985.
- BEINERT, H. ; KENNEDY, M. C. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. **FASEB J**, v. 7, n. 15, p. 1442-1449, 1993.
- BERMUDES, D. et al. Do prokaryotes contain microtubules? **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 387-400, 1994.

- BERNANDER, R. ; ETTEMA, T. J. FtsZ-less cell division in archaea and bacteria. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 6, p. 747-752, 2010.
- BI, E. F. ; LUTKENHAUS, J. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 354, n. 6349, p. 161-164, 1991.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**. São Paulo, v. 23, p. 101-111, 1957
- BIZZINI, A. et al. Effects of alpha-phosphoglucomutase deficiency on cell wall properties and fitness in *Streptococcus gordonii*. **Microbiology**, v. 153, p. 490-498, 2007.
- BRADBURY, A. J. et al. The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 142, p. 389-400, 1996.
- BURDETT, I. D. ; MURRAY, R. G. Septum formation in *Escherichia coli*: characterization of septal structure and the effects of antibiotics on cell division. **J Bacteriol**, v. 119, n. 1, p. 303-324, 1974.
- CALER, E. V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J**, v. 17, n. 17, p. 4975-4986, 1998.
- CHANG, Y. F. ; CARMAN, G. M. CTP synthetase and its role in phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Prog Lipid Res**, v. 47, n. 5, p. 333-339, 2008.
- CHEN, L. L. Identification of genomic islands in six plant pathogens. **Gene**, v. 374, p.134-141, 2006.
- CHIEN, C. T. et al. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 21, p. 9578-9582, 1991.
- COLETTA-FILHO et al Genetic diversity in *in vitro* collections of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* analysed with relationship to origin of strains. In: WORKSHOP ON *Xanthomonas citri*/CITRUS CANCKER, 2011, Ribeirão Preto. p. 85-87.
- CORDERO-ALBA, M. et al. SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IolR. **J Bacteriol**, v. 194, n. 16, p. 4226-4236, 2012.
- CSERZO, M. et al. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. **Prot Eng**, v. 10, n. 6, p. 673-676, 1997.
- CYTRYN, E. J. et al. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. **J Bacteriol**, v. 189, n. 19, p. 6751-6762, 2007.

DA SILVA, A. C., FERRO, J. A., REINACH, F. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

DAI, K. ; LUTKENHAUS, J. *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 173, n. 11, p. 3500-3506, 1991.

DE BOER, P. A. Advances in understanding *E. coli* cell fission. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 6, p. 730-737, 2010.

DINGWALL, A. et al. Expression of an early gene in the flagellar regulatory hierarchy is sensitive to an interruption in DNA replication. **J Bacteriol**, v. 174, n.6, p. 1760-1768, 1992.

DOCENA, C. **Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas ao Sistema de Dois-Componentes e aos Sistemas Secretórios do tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. In *Instituto de Química*, pp. 177. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006

DURAND-HEREDIA, J. et al. Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 194, n.12, p. 3189-3198, 2012.

DURAND-HEREDIA, J. M. et al. Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 193, n.6, p. 1405-1413, 2011.

EBERSBACH, G. et al. Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. **Mol Microbiol**, v, 68, n. 3, p. 720-735, 2008.

ERRINGTON, J. et al. Cytokinesis in bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 1, p. 52-65, table of contents, 2003.

FACINCANI, A. P. **Análise Proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**, pp. 151. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

FIELDS, S. **Protocols**. Disponível em : <<http://depts.washington.edu/sfields/protocols/protocols.html>>. Acesso em: maio 2013

FIELDS, S. ; SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, v. 340, n. 6230, p. 245-246, 1989.

FRIEDMAN, J. R. et al. ER tubules mark sites of mitochondrial division. **Science**, v. 334, n.6054, p. 358-362, 2011.

FUJIWARA, K. ; TAGUCHI, H. Filamentous morphology in GroE-depleted *Escherichia coli* induced by impaired folding of FtsE. **J Bacteriol**, v.189, n.16, p. 5860-5866, 2007.

FUNDECITRUS. **Incidência de cancro cítrico aumenta 39% no estado de São Paulo**, 2012. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/13-incidencia-de-cancro-citrico-aumenta-39-no-estado-de-sao-paulo>>. Acesso em: maio 2013

GOMES, S. L. et al. Expression of the *Caulobacter* heat shock gene dnaK is developmentally controlled during growth at normal temperatures. **J Bacteriol**, v. 172, n. 6, p. 3051-3059, 1990.

GONZALEZ, M. D. et al. Multiple interaction domains in FtsL, a protein component of the widely conserved bacterial FtsLBQ cell division complex. **J Bacteriol**, v. 192, n. 11, p. 2757-2768, 2010.

GRAHAM, J. H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol Plant Pathol**, v. 5, n.1, p. 1-15, 2004.

GRASSME, H. et al. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. **Nat Med**, v. 9, n. 3, p. 322-330, 2003.

GUEIROS-FILHO, F. Cell Division. In GRAUMANN, P. **Bacillus: Cellular and Molecular Biology**. Caister Academic Press, 2012.

GUEIROS-FILHO, F. J. ; LOSICK, R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. **Genes Dev**, v. 16, n.19, p. 2544-2556, 2002.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends Microbiol**, v. 15, n. 10, p. 456-461, 2007.

GULBINS, E. ; LI, P. L. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, p.11-26, 2006.

HADJIFRANGISKOU, M. et al. A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 80, n. 6, p. 1516-1529, 2011.

HALE, C. A. ; DE BOER, P. A. Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 175-185, 1997.

HALE, C. A. et al. Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. **J Bacteriol**, v. 193, n. 6, p. 1393-1404, 2011.

HASSE, C. H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**, v. IV, n. 1, p. 97-100, 1915.

HEIMAN, C. ; MILLER, C. G. *Salmonella typhimurium* mutants lacking protease II. **J Bacteriol**, v. 135, n. 2, p. 588-594, 1978.

HENIKOFF, S. et al. A large family of bacterial activator proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 18, p. 6602-6606, 1988.

HEUSIPP, G. et al. Regulation of htrA expression in *Yersinia enterocolitica*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 231, n. 2, p. 227-235, 2004.

HILL, C. W. et al. Rhs elements of *Escherichia coli*: a family of genetic composites each encoding a large mosaic protein. **Mol Microbiol**, v. 12, n.6, p. 865-871, 1994.

HO, Y. S. et al. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J**, v. 19, n. 20, p. 5288-5299, 2000.

HUNG, C. H. et al. Mutation in the *Xanthomonas campestris* xanA gene required for synthesis of xanthan and lipopolysaccharide drastically reduces the efficiency of bacteriophage (phi)L7 adsorption. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 291, n. 2, p. 338-343, 2002.

INGERSON-MAHAR, M. et al. The metabolic enzyme CTP synthase forms cytoskeletal filaments. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 8, p. 739-746, 2010.

JACOB, F. **O rato, a mosca e o homem**: Cia das Letras. 1998.

JALAN, N. et al. Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. **J Bacteriol**, v. 193, n. 22, p. 6342-6357, 2011.

JAMES, P. et al. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 1425-1436, 1996.

JOHANSEN, J. et al. Down-regulation of outer membrane proteins by noncoding RNAs: unraveling the cAMP-CRP- and sigmaE-dependent CyaR-ompX regulatory case. **J Mol Biol**, v. 383, n. 1, p. 1-9, 2008.

KANDROR, O. et al. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 15, p. 9727-9732, 2002.

KAPATRAL, V. ; MINNICH, S. A. Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. **Mol Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 49-56, 1995.

KEGG. **Two-component system - *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306**. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?xac02020>. Acesso em : abril 2013

KERNER, M. J. et al. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 209-220, 2005.

KIEFEL, B. R. et al. Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ. **Protist**, v. 155, n. 1, p. 105-115, 2004.

- KIM, Y. G. et al. Crystal structure of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence factor SrfJ, a glycoside hydrolase family enzyme. **J Bacteriol**, v. 191, n. 21, p. 6550-6554, 2009.
- KIRCHBERG, J. et al. Aconitase B is required for optimal growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper plants. **PLoS One**, v.7, n. 4, 2012.
- KNAPP, G. S. ; HU, J. C. Specificity of the E. coli LysR-type transcriptional regulators. **PLoS One**, v. 5, n. 12, 2010.
- KONKEL, M. E. et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **J Bacteriol**, v. 186, n. 11, p. 3296-3303, 2004.
- KOPLIN, R. et al. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. **J Bacteriol**, v. 174, n. 1, p. 191-199, 1992.
- KOSKINIEMI, S. et al. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Disponível em <<http://www.pnas.org/content/early/2013/04/08/1300627110>>, 2013.
- KRAISELBURD, I. et al. A LOV protein modulates the physiological attributes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* relevant for host plant colonization. **PLoS One**, v. 7, n. 6, 2012.
- KUNG, V. L. et al. An rhs gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 4 p. 1275-1280, 2012.
- KUROIWA, T. Mechanisms of organelle division and inheritance and their implications regarding the origin of eukaryotic cells. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 86, n. 5, p. 455-471, 2010.
- LAIA, M. L. et al. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiol**, v. 912, 2009.
- LAIA, M. L. D. (2007). **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* implicados na patogênese**, pp. 344. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- LAZAREVIC, V. et al. *Bacillus subtilis* alpha-phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 1 p. 39-45, 2005.
- LI, Z. et al. The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. **EMBO J**, v. 26, n. 22, p. 4694-4708, 2007.

LIN, R. J. et al. A repetitive DNA sequence, *rhs*, responsible for duplications within the *Escherichia coli* K-12 chromosome. **J Mol Biol**, v. 177, n. 1, p. 1-18, 1984.

LOTZ, J. W. **Citrus canker**, 2004. Disponível em :
<<http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1262023>>. Acesso em junho 2013

LOW, H. H. et al. The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. **J Mol Biol**, v. 341, n. 3, p. 839-852, 2004.

LOWE, J. ; AMOS, L. A. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. **Nature**, v. 391, n. 6663, p. 203-206, 1998.

LU, C. et al Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. **J Bacteriol**, v.182, n. 1, p. 164-170, 2000.

LUTKENHAUS, J. FtsZ ring in bacterial cytokinesis. **Mol Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 403-409, 1993.

LUTKENHAUS, J. F. et al. Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). **J Bacteriol**, v. 142, n. 2, p. 615-620, 1980.

LYON, W. R. ; CAPARON, M. G. Role for serine protease HtrA (DegP) of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factors SpeB and the hemolysin streptolysin S. **Infect Immun**, v. 72, n. 3, p. 1618-1625, 2004.

MA, Q. ; WOOD, T. K. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. **Environ Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 2735-2746, 2009.

MADDOCKS, S. E. ; OYSTON, P. C. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, v.154, n. 12, p. 3609-3623, 2008.

MAEZAWA, K. et al. Hundreds of flagellar basal bodies cover the cell surface of the endosymbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* sp. strain APS. **J Bacteriol**, v.188, n.18, p. 6539-6543, 2006.

MAGGI, S. et al. Division protein interaction web: identification of a phylogenetically conserved common interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 3042-3052, 2008.

MALAMUD, F. et al. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 819-829, 2011.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. p D348-352, 2013.

MARTINS, P. M. et al. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiol Lett**, 310,1 76-83, 2010.

McLENNAN, N. ; MASTERS, M. GroE is vital for cell-wall synthesis. **Nature**, v. 392, n. 6672, p. 139, 1998.

METZNER, M. et al. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex sigma S-dependent *csiD-ygaF-gabDTP* operon in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 799-811, 2004.

MICHIE, K. A. ; LOWE, J. Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. **Annu Rev Biochem**, p. 75467-92, 2006.

MIKI, T. et al. Control of cell division by sex factor F in *Escherichia coli*. III. Participation of the *groES* (*mopB*) gene of the host bacteria. **J Mol Biol**, v. 201, n. 2, p. 327-338, 1988.

MINAMINO, M. et al. Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2071-81, 2003.

MOHAMMADI, T. et al. The GTPase activity of *Escherichia coli* FtsZ determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA in vitro. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11056-66, 2009.

MOREIRA, L. M. **Análise estrutural e funcional do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***, pp. 328. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006

MOREIRA, L. M. et al. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, 2010.

MOREIRA, L. M. et al. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annu Rev Phytopathol**, p. 42163-84, 2004.

MOREIRA, L. M. et al. Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. **OMICS**, 9,1 43-76, 2005.

MORI, T. et al. Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 19, p. 10183-8, 1996.

MORI, T. ; JOHNSON, C. H. Independence of circadian timing from cell division in cyanobacteria. **J Bacteriol**, v. 183, n. 8, p. 2439-2444, 2001.

MUIR, R. E. et al. The trans-acting flagellar regulatory proteins, FliX and FlbD, play a central role in linking flagellar biogenesis and cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. **Microbiology**, v. 151, n. 11, p. 3699-3711, 2005.

- MUKHERJEE, A. ; LUTKENHAUS, J. Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. **EMBO J**, v. 17, n. 2, p. 462-469, 1998.
- NANNINGA, N. Morphogenesis of *Escherichia coli*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 110-129, 1998.
- NOGALES, E. et al. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. **Nat Struct Biol**, v. 5, n. 6, p. 451-458, 1998.
- NOONE, D. et al. Signal perception by the secretion stress-responsive CssRS two-component system in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, v. 194, n. 7, p. 1800-1814, 2012.
- NOREE, C. et al. Identification of novel filament-forming proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. **J Cell Biol**, v. 190, n. 4, p. 541-551, 2010.
- O, Y. K. et al. Abnormal septation and inhibition of sporulation by accumulation of L-glycerophosphate in *Bacillus subtilis* mutants. **J Bacteriol**, v. 113, n. 2, p. 1034-1045, 1973.
- ORME, R. et al. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. **Proteomics**, v. 6, n. 15, p. 4269-4277, 2006.
- OSAWA, M. et al. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. **Science**, v. 320, n. 5877, p. 792-794, 2008.
- OSTERYOUNG, K. W. ; VIERLING, E. Conserved cell and organelle division. **Nature**, v. 376, n. 6540, p. 473-474, 1995.
- PACHECO-GOMEZ, R. et al. Tetramerization of ZapA is required for FtsZ bundling. **Biochem J**, v. 449, n. 3, p. 795-802, 2013.
- PALACIOS, S. ; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. 2-Methylcitrate-dependent activation of the propionate catabolic operon (prpBCDE) of *Salmonella enterica* by the PrpR protein. **Microbiology**, v. 150, n. 11, p. 3877-3887, 2004.
- PELVE, E. A. et al. Cdv-based cell division and cell cycle organization in the thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus*. **Mol Microbiol**, v. 82, n.3, p. 555-566, 2011.
- PEREZ-RUEDA, E. ; COLLADO-VIDES, J. Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. **J Mol Evol**, v. 53, n. 3, p. 172-179, 2001.
- PETERSEN, L. et al. Genes under positive selection in *Escherichia coli*. **Genome Res**, v. 17, n. 9, p.1336-1343, 2007.
- PHADTARE, S. ; INOUE, M. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 186, n. 20, p. 7007-7014, 2004.

- PICHOFF, S. ; LUTKENHAUS, J. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. **Mol Microbiol**, v. 55, n. 6, p. 1722-1734, 2005.
- PIERETTI, I. et al. Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. **BMC Genomics**, 2012.
- POLGAR, L. The prolyl oligopeptidase family. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 2, p. 349-362, 2002.
- PORNWIROON, W. et al. Proteomic analysis of *Rickettsia parkeri* strain portsmouth. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5262-5271, 2009.
- POTLURI, L. P. et al. ZipA is required for FtsZ-dependent preseptal peptidoglycan synthesis prior to invagination during cell division. **J Bacteriol**, v. 194, n. 19, p. 5334-5342, 2012.
- PRADHAN, B. B. et al. XadM, a novel adhesin of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, exhibits similarity to Rhs family proteins and is required for optimum attachment, biofilm formation, and virulence. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 25, n. 9, p. 1157-1170, 2012.
- QIAN, G. et al. Proteomic analysis reveals novel extracellular virulence-associated proteins and functions regulated by the diffusible signal factor (DSF) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **J Proteome Res**, 2013.
- RAIN, J. C. et al. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 211-215, 2001.
- RASKIN, D. M. ; DE BOER, P. A. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 9, p. 4971-4976, 1999.
- REINA-BUENO, M. et al. Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, 2012.
- RODRIGUES, C. D. ; HARRY, E. J. The Min system and nucleoid occlusion are not required for identifying the division site in *Bacillus subtilis* but ensure its efficient utilization. **PLoS Genet**, v. 8, n. 3, 2012.
- SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 2nd Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst Appl Microbiol**, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.

SCHAAD, N. W. et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Syst Appl Microbiol**, 28,6 494-518, 2005.

SCHEFFERS, D. J. The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA. **FEBS Lett**, v. 582, n. 17, p. 2601-2608, 2008.

SCHNEIDER, B. L. et al. The *Escherichia coli* gabDTPC operon: specific gamma-aminobutyrate catabolism and nonspecific induction. **J Bacteriol**, v. 184, n. 24, p. 6976-6986, 2002.

SCHUBERT, T. **Citrus canker**, 2004. Disponível em: <<http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1262012>>. Acesso em: junho 2013

SISTO, A. et al. An Rhs-like genetic element is involved in bacteriocin production by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 4, p. 505-517, 2010.

SMALL, E. et al. FtsZ polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP. **J Mol Biol**, v. 369, n. 1, p. 210-221, 2007.

SMIRNOVA, G. V. ; OKTYABRSKY, O. N. Glutathione in bacteria. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 11, p. 1199-1211, 2005.

SMITH, S. G. et al. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS Microbiol Lett**, v. 273, n. 1, p. 1-11, 2007.

STRICKER, J. et al. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n. 99, v. 5, p. 3171-3175, 2002.

SUSIN, M. F. et al. GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 23, p. 8044-8053, 2006.

TANG, Y. ; GUEST, J. R. Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. **Microbiology**, v.145, n. 11, p. 3069-3079, 1999.

TASCHNER, P. E. et al. Division behavior and shape changes in isogenic *ftsZ*, *ftsQ*, *ftsA*, *pbpB*, and *ftsE* cell division mutants of *Escherichia coli* during temperature shift experiments. **J Bacteriol**, v. 170, n. 4, p. 1533-1540, 1988.

TAYLOR, B. L. ; ZHULIN, I. B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 63, n. 2, p. 479-506, 1999.

THOME, P. E. Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 3, p. 229-235, 2007.

TREUNER-LANGE, A. et al. PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. **Mol Microbiol**, v. 87, n. 2, p. 235-253, 2013.

TSUI, H. C. et al. Dynamic distribution of the SecA and SecY translocase subunits and septal localization of the HtrA surface chaperone/protease during *Streptococcus pneumoniae* D39 cell division. **MBio**, v. 2, n. 5, 2011.

UETZ, P. et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 623-627, 2000.

ULRICH, L. E. et al. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 2, p. 52-56, 2005.

VAUGHAN, S. et al. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. **J Mol Evol**, v. 58, n.1, p. 19-29, 2004.

VERGAUWEN, B. et al. Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *Haemophilus influenzae*. **J Bacteriol**, v. 185, n. 5, p. 1572-1581, 2003.

VICENTE, M. ; LOWE, J. Ring, helix, sphere and cylinder: the basic geometry of prokaryotic cell division. **EMBO Rep**, v. 4, n. 7, p. 655-660, 2003.

VOGT, S. L. ; RAIVIO, T. L. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. **FEMS Microbiol Lett**, v. 326, n. 1, p. 2-11, 2012.

VUILLEUMIER, S. ; PAGNI, M. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 58, n. 2, p. 138-146, 2002.

WALKER, J. R. et al. Regulation of bacterial cell division: temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* that are defective in septum formation. **J Bacteriol**, v. 123, n. 2, p. 693-703, 1975.

WANG, X. ; LUTKENHAUS, J. FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in archaeobacteria. **Mol Microbiol**, v. 21, n. 2, p. 313-319, 1996.

WANG, Y. The function of OmpA in *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 292, n. 2, p. 396-401, 2002.

WEISER, J. N. ; GOTSCHLICH, E. C. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. **Infect Immun**, v. 59, n. 7, p. 2252-2258, 1991.

WEISS, D. S. Bacterial cell division and the septal ring. **Mol Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 588-597, 2004.

WENGELNIK, K. ; BONAS, U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **J Bacteriol**, v. 178, n. 12, p. 3462-3469, 1996.

WHITE-ZIEGLER, C. A. et al. Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. **Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 148-166, 2008.

WILLEMSE, J. et al. Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. **Genes Dev**, v. 25, n. 1, p. 89-99, 2011.

WILLIAMS, K. et al. Investigation into the role of the serine protease HtrA in *Yersinia pestis* pathogenesis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 186, n. 2, p. 281-286, 2000.

WILSON, R. L. et al. *Listeria monocytogenes* 10403S HtrA is necessary for resistance to cellular stress and virulence. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 765-768, 2006.

WILSON, T. J. et al. The rpfA gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. **Mol Microbiol**, v. 28, n. 5, p. 961-970, 1998.

YANG, T. C. et al. Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. **J Bacteriol**, v. 191, n. 7, p. 2266-2275, 2009.

YOSHIDA, Y. et al. The bacterial ZapA-like protein ZED is required for mitochondrial division. **Curr Biol**, v. 19, n. 17, p. 1491-1497, 2009.

YOUDEIRIAN, P. ; HARTZELL, P. L. Triple mutants uncover three new genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. **Genetics**, v. 177, n. 1, p. 557-566, 2007.

YU, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010.

YU, X. et al. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 5, p. E425-434, 2013.

ZANDONADI, F. D. S. **Análise proteômica diferencial da fração periplásmica das estirpes A, B e C de *Xanthomonas* spp. que diferem na patogenicidade e espectro de citros hospedeiros.** In *Departamento de Genética e Evolução*, pp. 119. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.

ZHANG, B. et al. Yeast three-hybrid system to detect and analyze interactions between RNA and protein. **Methods Enzymol**, p. 30693-113, 1999.

ZHANG, X. et al. Deficiency in L-serine deaminase interferes with one-carbon metabolism and cell wall synthesis in *Escherichia coli* K-12. **J Bacteriol**, v. 192, n. 20, p. 5515-5525, 2010.