

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INVESTIGANDO POSSÍVEIS INTERAÇÕES FÍSICAS ENTRE
COMPONENTES DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE
FOSFATO E DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM
Xanthomonas citri subsp. *citri***

Jéssica Alcimari Ferreira Mello

Bióloga

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INVESTIGANDO POSSÍVEIS INTERAÇÕES FÍSICAS ENTRE
COMPONENTES DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE
FOSFATO E DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM
Xanthomonas citri subsp. *citri***

Jéssica Alcimari Ferreira Mello

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Túlio Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2019

M527i

Mello, Jéssica Alcimari Ferreira

Investigando possíveis interações físicas entre componentes do sistema de detecção de fosfato e do sistema de secreção tipo III em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Jéssica Alcimari Ferreira Mello. -- Jaboticabal, 2019

59 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Alessandro de Mello Varani

Coorientador: Marcos Túlio Oliveira

1. T3SS. 2. TCS PhoR/PhoB. 3. Expressão Heteróloga. 4. Purificação de Proteínas. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

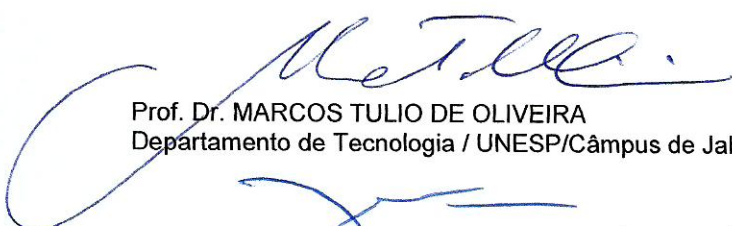
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INVESTIGANDO POSSÍVEIS INTERAÇÕES FÍSICAS ENTRE COMPONENTES DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE FOSFATO E DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

AUTORA: JÉSSICA ALCIMARI FERREIRA MELLO
ORIENTADOR: ALESSANDRO DE MELLO VARANI
COORDENADOR: MARCOS TULIO DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA
Departamento de Tecnologia / UNESP/Câmpus de Jaboticabal



Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Unesp/Câmpus de Rio Claro

Jaboticabal, 12 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Jéssica Alcimari Ferreira Mello, nascida em 3 de julho de 1995, em Araraquara, SP. Concluiu em 2012 o Ensino Médio no Colégio Santo André, Jaboticabal, SP. Em 2013 ingressou no Curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus Jaboticabal, SP, vindo a graduar-se em 2016. Em 2017, iniciou o mestrado no curso de Pós-Graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas também na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, com auxílio financeiro da CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani e coorientação do Prof. Dr. Marcos Túlio Oliveira, onde desenvolveu pesquisas na área de biologia molecular, expressando e purificando proteínas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, com o objetivo de elucidar o início do desenvolvimento dos mecanismos de patogenicidade. Em sua vida acadêmica, estagiou Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica, sob a orientação do Prof, Dr. Jesus Aparecido ferro aonde concluiu a Iniciação Científica com auxílio financeiro da agência de fomento CNPQ. Participou do Projeto de extensão Cultivaeco – Educação Ambiental, Agricultura e Segurança Alimentar na Educação Básica, e atuou como membro estatutário do Centro Acadêmico Alfred Russel Wallace do curso de Ciências Biológicas.

DEDICATÓRIA

À minha família...

Em especial aos meus pais, Nelson Luiz e Odália, meus primeiros professores, que com paciência me ensinaram através de exemplos, tantos valores e responsabilidades, por sempre me protegerem, me apoiarem e acreditarem nos meus sonhos.

Às minhas avós Mariana e Alcídia *In memoriam*, ambas que partiram durante o tempo de desenvolvimento deste trabalho e que cuidaram de mim com tanto carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo o apoio, investimento, por todos os dias de motivação e por me ajudarem sempre a evoluir pessoalmente e profissionalmente. Também a minha irmã por ser um exemplo de profissional.

Ao meu companheiro Luís Fernando por ser meu melhor amigo, meu apoio, por acreditar no meu potencial e por me ajudar a buscar sempre o melhor em mim.

Aos professores Alessandro e Marcos Túlio, pelas orientações, pela oportunidade e por terem me ajudado a crescer como profissional.

Ao professor Jesus, Maria Inês e Tiago, pelos conselhos, sugestões e pelo espaço concedido para uso do laboratório (LBM).

Aos meus companheiros de Laboratório em especial Catarina, Ana Carolina, Flávia mãe, Flavinha, Marina, Ana Paula, Geovana, Amanda, Helen, Helô, Luana, Julie, Tami, Yoshi, Rafael, Luis Tehran e tantos outros que tornaram todos os anos de trabalho muito mais divertidos e leves.

Ao CREBIO pela concessão dos cosmídeos e materiais utilizados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 O gênero <i>Xanthomonas</i> e o Cancro Cítrico	15
2.2 O Sistema de secreção do tipo III	16
2.2.1 Injectossoma.....	18
2.2.2 Chaperonas	21
2.2.3 Efetores	22
2.2.4 Reguladores	23
2.3 O sistema de dois componentes	24
2.3.1 Histidina quinase	25
2.3.2 Regulador de resposta.....	26
2.3.3 Relação do T3SS com o TCS PhoR/PhoB	27
2.4 Expressão Heteróloga de Proteínas.....	29
2.5 Purificação de Proteínas	31
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Linhagens	32
4.2 Amplificação e Clonagem no Vetor de Expressão.....	32
4.3 Ensaio de expressão e solubilidade das proteínas	37
4.4 Purificação das proteínas recombinantes	38
4.5 Diálise e quantificação de proteínas	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Construção dos plasmídeos de expressão	39
5.2 Verificação da construção correta nas clonagens dos genes <i>hrpG</i> , <i>phoB</i> e <i>phoR</i>	41
5.3 Indução e solubilidade das proteínas	44
5.4 Purificação.....	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS50

CTNBio

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança aprovou o desenvolvimento do projeto intitulado “INVESTIGANDO POSSÍVEIS INTERAÇÕES FÍSICAS ENTRE COMPONENTES DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE FOSFATO E DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri*”.

INVESTIGANDO POSSÍVEIS INTERAÇÕES FÍSICAS ENTRE COMPONENTES DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE FOSFATO E DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) é um fitopatógeno responsável por causar o Cancro Cítrico, relacionado a grandes perdas econômicas para a citricultura. Esta bactéria utiliza diversos mecanismos moleculares para infectar o hospedeiro, dentre eles, o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS), considerado o principal fator de virulência expresso *in planta* pela *Xac*. Sabe-se que a ativação do T3SS é controlada por dois reguladores: HrpG e HrpX. Porém, os mecanismos que controlam estes reguladores e posteriormente a expressão do T3SS *in planta* ainda são pouco compreendidos. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa sugerem que a concentração de fosfato inorgânico (Pi) presente em meio de cultura ou em espaço apoplástico, onde a *Xac* causa a infecção em plantas, pode estar relacionado com a ativação do T3SS, sugerindo uma possível relação entre o Pi com os reguladores HrpG e HrpX. Em *Xac*, a detecção e transportorte do Pi é realizada pelo sistema de dois componentes (TCS) PhoR/PhoB, codificado pelo operon *pho*. Afim de averiguar a possível relação entre PhoR/PhoB com os reguladores do T3SS HrpG e HrpX, ensaios de modelagem molecular foram realizados, indicando que a proteína PhoR poderia interagir fisicamente com HrpG, fosforilando-a, e sugerindo um possível mecanismo de interação entre o TCS PhoR/PhoB e os genes reguladores do T3SS. Para testar a hipótese de interação física entre HrpG e PhoR, as proteínas recombinantes PhoR, PhoB e HrpG de *Xac* foram expressas em células de *Escherichia coli* BL21 com a finalidade de realização de ensaios de *pull-down*. Através da purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺-Sepharose, as proteínas HrpG e PhoB recombinantes foram obtidas com alto grau de pureza e na forma solúvel. Entretanto a proteína PhoR se mostrou insolúvel em todos os testes de purificação e de renaturação realizados, impossibilitando a realização dos ensaios de interação física até o momento. De qualquer modo, este trabalho representa importantes avanços sobre a regulação do T3SS em *Xac*, tendo em vista que até o atual momento configura-se como o primeiro estudo relacionando o TCS PhoR/PhoB com HrpG.

Palavras-chave:

T3SS, TCS PhoR/PhoB, expressão heteróloga, purificação de proteínas.

**INVESTIGATING POSSIBLE PHYSICAL INTERACTIONS BETWEEN
COMPONENTS OF THE PHOSPHATE DETECTION SYSTEM AND
TYPE III SECRETION SYSTEM IN *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

ABSTRACT - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) is a plant pathogen that causes citrus canker, responsible for significant economic losses in citriculture. This bacteria uses several molecular mechanisms to infect the host, such as the Type III Secretion System (T3SS), which is considered the main factor of virulence expressed *in planta* by *Xac*. Activation of T3SS is controlled by two regulators, HrpG and HrpX, however, the mechanisms that control these regulators and subsequently the expression of T3SS *in planta* are poorly understood. Previously, our research group identified that the concentration of inorganic phosphate (Pi) present in culture media or in the apoplastic space, where *Xac* causes infection in plants, may be related to the activation of T3SS, suggesting a possible relationship between Pi and the HrpG and HrpX regulators. In *Xac*, the detection and transport of Pi is performed by the two-component system (TCS) PhoR/PhoB, encoded by the operon *pho*. In order to investigate the possible relationship between PhoR/PhoB and the regulators of T3SS HrpG and HrpX, molecular modeling analyses were performed and indicated that the PhoR protein could physically interact with HrpG and phosphorylate it, suggesting a possible mechanism of interaction between TCS PhoR / PhoB and the T3SS regulatory genes with subsequent activation of T3SS. To test the hypothesis, recombinant forms of PhoR, PhoB and HrpG were expressed in *Escherichia coli* BL21 cells for the purpose of performing pull-down assays. By using Ni²⁺-Sepharose affinity chromatography, recombinant HrpG and PhoB proteins were obtained with high purity and in their soluble forms. However, the PhoR protein was insoluble in all the purification and renaturation tests performed, making the subsequent physical tests impossible. Nevertheless, this work represents important towards the understanding of T3SS regulation in *Xac*, since this is the first study correlating the TCS PhoR /PhoB proteins and HrpG.

Key words:

T3SS, TCS PhoR/PhoB, heterologous expression, protein purification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo da estrutura do aparato do T3SS das bactérias do gênero *Xanthomonas*. Os principais componentes funcionais do aparato T3SS descritos neste modelo são injectossoma, efetores, chaperonas e reguladores. Fonte: Mendoza (2016).
- Figura 2 - Esquema da regulação do T3SS por HrpG e HrpX, evidenciando captação de um estímulo ambiental (desconhecido) e as interações entre uma proteína HK ainda não identificada e a RR HrpG. Quando fosforilada HrpG leva a expressão de HrpX que por sua vez ativa a expressão de outros genes do regulon hrp. Fonte: Wengelnik, Marie *et al.* (1996)
- Figura 3 - Diagrama esquemático de um TCS. Um estímulo ambiental é captado, a HK (HikK) em amarelo autofosforila-se e transfere um grupo fosfato para a proteína RR em verde. Fonte: Gao *et al.* (2007).
- Figura 4 - Estrutura geral da HK VicK de *S. mutans* e seus domínios HAMP, PAS, DHP/Ca correspondentes. Fonte: Wang, Chen. *et al.* (2013).
- Figura 5 - Efeito do Pi sobre a expressão de três genes do T3SS em *Xac* no meio de cultura XVM2. O meio XVM2 normal (representado pela coloração escura) com baixa concentração de Pi, simulando as condições que a *Xac* encontra *in planta*, acarretou na superexpressão do T3SS. No meio XVM2 com altas concentrações de Pi é demonstrado que há uma drástica diminuição da expressão dos genes de T3SS (representado pela coloração clara) Fonte: Mendoza (2016).
- Figura 6 - Modelagem molecular das proteínas PhoR, PhoB e HrpG de *Xac*. Regiões modeladas em PhoR, PhoB e HrpG que poderiam estar envolvidas no processo de fosforilação são mostradas em destaque. Os modelos estruturais foram gerados no servidor on-line Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>). O programa utilizado para a visualização gráfica de todas as estruturas tridimensionais foi o PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) Fonte: Mendoza (2016).
- Figura 7 - Esquema do ensaio de Pull-Down, ilustrando as possíveis interações entre HrpG e PhoR na coluna de Ni²⁺-Sephrose e a forma de análise dos resultados no gel de SDS-PAGE. Fonte: Adaptado de Thermo Fisher Scientific Pull-Down Assays.
- Figura 8 - Modelagem molecular das proteínas PhoR, PhoB e HrpG de *Xac*. Regiões modeladas em PhoR, PhoB e HrpG que estão envolvidas no processo de fosforilação. Fonte: Mendoza (2016).
- Figura 9 - Representação da sequência de aminoácidos que constituem as proteínas Hrp, PhoR e PhoB de *Xac*. Áreas hachuradas na cor cinza indicam as regiões escolhidas para clonagem no vetor de expressão pET SUMO.

- Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10mg/mL) contendo produtos de amplificação das regiões codificadoras das sequencias de aminoácidos mostradas na Figura 9. Coluna M corresponde ao marcador molecular 1 kb (DNA Ladder Promega); colunas 1, 3 e 5 correspondem aos produtos de amplificação dos genes *hrpG*, *phoR* e *phoB*, respectivamente, a partir de DNA cosmidial da biblioteca de *Xac* colunas 2, 4 e 6 correspondem aos produtos de amplificação dos genes *hrpG*, *phoR* e *phoB*, respectivamente, a partir de DNA genômico de *Xac*
- Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) contendo os produtos de PCR. (A) Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular *O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ready-to-use*, colunas de 1 a 5 correspondem aos produtos de PCR do gene *hrpG* com 363 pb, colunas 7 a 11 correspondem aos produtos de PCR do gene *phoB* com 360 pb, colunas 6 e 12 correspondem aos controles negativos das reações. (B) Coluna M corresponde ao marcador de pesomolecular *O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ready-to-use*, colunas de 1 a 5 correspondem aos produtos de PCR do gene *phoR* com 693 pb, coluna 6 corresponde ao controle negativo da reação.
- Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/MI) contendo produtos de PCR de colônia. A, B e C correspondem às amplificações usando como molde *E. coli* DH10B transformadas com os vetores recombinantes pET-SUMO-*hrpG*, pET-SUMO-*phoR* e pET-SUMO-*phoB*, respectivamente. As PCRs foram realizadas utilizando os primers *Forward* de cada gene de interesse (*HrpG*, *PhoR* e *PhoB*) e o primer *Reverse* do vetor.
- Figura 13 - Mapa do vetore recombinante pET-SUMO contendo parcialmente o gene *phoR* de *Xac*. Adaptado do manual de *Champion™ pET SUMO Protein Expression System*.
- Figura 14: Resultado do sequenciamento dos vetores de expressão clonados em *E. coli*. As sequencias de nucleotídeos demonstram as construções His-SUMO-*HrpG*, His-SUMO-*PhoR* e His-SUMO-*PhoB*, respectivamente. Os nucleotídeos do vetor pET SUMO estão evidenciado na coloração azul; as sequencias dos oligonucleotídeos estão em vermelho e as sequências dos genes parcialmente clonados de interesse estão demonstradas em cinza.
- Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando experimentos de indução das proteínas *HrpG*, *PhoR* e *PhoB*. MW –marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker®*– Fermentas. N. Ind.- Frações celulares não induzidas. Ind. – Frações celulares após o processo de indução com IPTG. Sob - Fração sobrenadante. Pellet – Fração precipitada. As setas nas proteínas *HrpG*

e PhoB indicam que, em ambas a maior porcentagem das proteínas de interesse permanece na fração solúvel. Já a seta em PhoR indica que a proteína não estava presente em sua maior proporção na fração solúvel.

Figura 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando testes de solubilidade da proteína PhoR com os detergentes e concentrações indicados. 1, frações não induzidas; 2, frações induzidas das proteínas em *E. coli* BL21; 3, frações dos sobrenadantes ou frações solúveis e 4, proteínas encontradas nos precipitados. As setas indicam que não houve aumento significativo da solubilidade de PhoR, mesmo após a adição dos detergentes.

Figura 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando o resultado da purificação via coluna de Ni²⁺-Sephrose das proteínas HrpG e PhoB. MW - Marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*®-Fermentas. Sob- Fração solúvel. Pellet- Fração insolúvel. FT- *Flow throw. Wash* – fração das lavagens na coluna. Números 8 até 16 – tubos contendo as frações retiradas da coluna cromatográfica, correspondentes ao pico de eluição indicado pela absorbância a 280nm no aparelho ÄKTA prime plus (GE Healthcare Life Sciences).

Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando o resultado da purificação via coluna de Ni²⁺-Sephrose da proteína recombinante PhoR com tampão desnaturante contendo 8M de ureia. MW - Marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*®-Fermentas. N. Ind- Amostra não induzida; Ind. Amostra induzida; Sob- Fração solúvel. Pellet- Fração insolúvel. FT- *Flow throw. Wash* – Fração das lavagens na coluna. Números 6 até 12 – tubos contendo as frações retiradas da coluna cromatográfica de afinidade.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação parcial dos genes *phoR*, *phoB* e *hrpG*.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) é o agente causal do Cancro Cítrico asiático ou tipo A, doença que afeta todas as variedades de citros de importância econômica, causando perda na produtividade e conseqüentemente grandes prejuízos à citricultura (Graham *et al.*, 2004). Esta bactéria possui o Sistema de Secreção do tipo III (T3SS) como principal fator de virulência, responsável pelo processo de infecção em seus hospedeiros. Este sistema de secreção está presente em diversas outras bactérias de interesse médico e veterinário, fazendo com que no decorrer das últimas décadas, o T3SS fosse bastante estudado pela comunidade científica. Mesmo com a importância que este sistema possui para a patogenicidade, ainda não é completamente conhecido os mecanismos de regulação do T3SS. Não se tem conhecimento, por exemplo, quais são os estímulos responsáveis pelo controle e início de ativação, gerando lacunas que impossibilitam o desenvolvimento de métodos baseados na inativação do T3SS, que levariam ao controle desta e outras doenças causadas por bactérias portadoras do T3SS.

Estudos de expressão gênica e proteômica realizados em *Xac* inoculadas em citros (*Citrus sinensis*) sugerem que os genes do T3SS são expressos nos estágios iniciais da doença, aproximadamente 72h após a infecção (Facincani *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2014), o que é consistente com a ideia de que este sistema é o principal fator de virulência utilizado pela bactéria durante o processo de instalação no hospedeiro (Buttner e He, 2009; Buttner e Bonas, 2010). A *Xac* utiliza o T3SS para injetar proteínas efetoras dentro das células hospedeiras, alterando as vias de sinalização e principalmente sua resposta de defesa (Hueck, 1998; Boch e Bonas, 2010). Este mecanismo é conservado em diversas bactérias patogênicas de animais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Jude *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2004; Jennings *et al.*, 2012), e de plantas como em outras espécie de *Xanthomonas* e de outros gêneros, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Ralstonia solanacearum* (Winans, 1990; Yoshimochi *et al.*, 2009). Diversos estudos baseados em alterações nos genes do T3SS de *Xanthomonas* têm demonstrado que a deleção destes genes anulam a capacidade da bactéria de infectar e colonizar as células do hospedeiro (Qian *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Laia *et al.*, 2009; Yan e Wang, 2012). Por isso, acredita-se que o estudo detalhado do T3SS poderá levar a elucidação do sistema biológico responsável por causar a

patogenicidade de *Xac*, e talvez, de outras bactérias patogênicas que utilizem do mesmo sistema.

Em *Xanthomonas*, o T3SS é regulado principalmente pelas proteínas HrpG e HrpX (Wengelnik, Van Den Ackerveken, *et al.*, 1996; Noel *et al.*, 2001; Gurlebeck *et al.*, 2006). A proteína HrpG é um regulador de resposta (RR) órfão de um sistema de dois componentes (TCS = *Two Component System*), para o qual ainda não é conhecida a proteína histidina quinase (HK) encarregada da fosforilação e ativação. Quando HrpG é ativada (possivelmente fosforilada pela respectiva HK desconhecida), leva à transcrição e tradução do regulador HrpX, que por sua vez, regula a expressão de muitos genes do regulon *hrp*, cujos produtos são constituintes essenciais do T3SS (Wengelnik, Van Den Ackerveken, *et al.*, 1996; Noel *et al.*, 2001; Gurlebeck *et al.*, 2006).

Os genes do regulon *hrp* são induzidos em meios de cultura mínimos e no apoplasto celular, o que sugere a ativação do T3SS em resposta a limitação de nutrientes (Schulte e Bonas, 1992; Tsuge *et al.*, 2006). A expressão do regulon *hrp* também é induzida quando a bactéria é colocada em meio de cultura XVM2, pelo fato de mimetizar as condições nutricionais do apoplasto dos hospedeiros (Wengelnik, Van Den Ackerveken, *et al.*, 1996). Portanto, acredita-se que em resposta aos estímulos ambientais (no caso, o déficit nutricional) a bactéria induz a expressão de seus principais fatores de virulência e dessa forma consegue colonizar o ambiente apoplástico.

Um estudo recente realizado por nosso grupo de pesquisa, baseado em análises dos dados de RNA-seq de *Xac* em condições *in vitro* e *in vivo* (Mendoza, 2016), sugere uma relação direta entre a expressão dos genes do regulon *pho* e o T3SS. O TCS PhoR/PhoB é o responsável por controlar a expressão do regulon *pho* nas bactérias em resposta às concentrações de fosfato inorgânico (Pi) presentes no ambiente (Jacobsen *et al.*, 2008; Lamarche *et al.*, 2008). Mendoza (2016) mostrou que a concentração externa de Pi pode ter um papel importante na regulação e expressão de genes do T3SS, possivelmente servindo como um sinal externo indutor de virulência nesta bactéria, tendo em vista que o nocaute dos genes *phoR* e *pstB* (que fazem parte do regulon *pho*) resultou na perda de virulência, redução do crescimento bacteriano *in vivo*, limitada agregação e formação de biofilme *in vitro*, e alteração na expressão dos genes do T3SS. De fato, a relação entre o regulon *pho* e a virulência das bactérias já foi observada em alguns organismos, tais como *Proteus mirabilis*, *E.*

coli, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* spp. (Jacobsen *et al.*, 2008; Lamarche *et al.*, 2008; Crepin *et al.*, 2011; Chekabab *et al.*, 2014), entretanto apenas poucos estudos realizados principalmente com patógenos de animais (*Edwardsiella tarda*) relacionam o regulon *pho* com a regulação dos genes do T3SS (Rao *et al.*, 2004; Chakraborty *et al.*, 2011; Chekabab *et al.*, 2014).

Mendoza (2016) também sugeriu, através de análises de modelagem molecular, que a HK PhoR poderia fosforilar tanto HrpG como PhoB, devido à alta similaridade estrutural entre estas duas últimas proteínas. Os resultados indicam que PhoR pode interagir fisicamente com HrpG, utilizando do mesmo mecanismo de fosforilação de PhoB para fosforilar HrpG, e, desta forma, iniciar a cascata de ativação do T3SS. Apesar da estrutura cristalográfica da proteína HrpG de *Xac* ainda não ter sido descrita, os ensaios de modelagem foram realizados com relativa confiabilidade devido a esta apresentar significativa similaridade de sequência compartilhada com PhoB (cerca de 44% de similaridade de aminoácidos). Para simular as interações proteína-proteína *in silico*, as proteínas do TCS de *Xac* foram sobrepostas às proteínas do TCS do microorganismo *Thermotoga maritima* (código PDB: 4JAS) disponível no banco de dados Protein Data Bank (Podgornaia *et al.*, 2013). Sendo assim, testar se as proteínas PhoR e HrpG podem interagir, e, por consequência estar relacionadas com a cascata de ativação do T3SS, configura-se como uma importante proposta que pode elucidar os mecanismos moleculares responsáveis pela ativação do principal sistema que desencadeia o início do Cancro Cítrico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Xanthomonas* e o Cancro Cítrico

A citricultura é uma das agroindústrias brasileiras mais destacadas e de maior importância econômica e social para nosso país e exerce grande impacto também no âmbito internacional, já que o Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo. No entanto, a indústria citrícola, assim como qualquer indústria agropecuária, é ameaçada por problemas envolvendo pragas, doenças e problemas climáticos que diminuem a produtividade da cultura e que dificultam sua venda e consumo. Dentre as doenças que mais acometem os citros, se encontram o Cancro Cítrico e o Greening.(Graham *et al.*, 2004).

A forma predominante e mais prejudicial da doença é o Cancro Cítrico asiático ou cancrose “A”, causada pela *Xac*. Por atacar a grande maioria das espécies de citros (Civerolo, 1984), esta bactéria é considerada a mais virulenta do gênero *Xanthomonas* e, portanto, foi selecionada como organismo modelo para o desenvolvimento deste trabalho. Existem também outras cancroses, como a cancrose “B”, causada pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B, a cancrose tipo “C”, causada pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, e a cancrose tipo E, causada por *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Jaciani et al., 2009; Jalan et al., 2014).

Uma vez em contato com a planta, o fitopatógeno pode penetrar por aberturas naturais nos tecidos jovens, como estômatos e hidatódios ou por meio de ferimentos em tecidos maduros (Brown, 2001). Além destes mecanismos, a bactéria também pode ser disseminada pelo do homem, através da maquinaria utilizada durante a colheita, implementos agrícolas e roupas que contenham o inóculo da bactéria. A dispersão do Cancro Cítrico ocorre geralmente por vento e chuva alcançando pequenas distâncias, dentro da própria árvore ou em árvores vizinhas. Os sintomas do Cancro podem ser observados nas folhas, ramos e frutos como lesões circulares, corticosas, eruptivas, de coloração parda e circundadas por um halo amarelo (Koller et al., 1993). Essas características tornam os frutos impróprios para o mercado de frutas frescas, mas não impossibilitam a extração e comercialização do suco da fruta, uma vez que as lesões não atingem a poupa das mesmas.

2.2 O Sistema de secreção do tipo III

O Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS) é um mecanismo de virulência que diversas bactérias Gram-negativas utilizam para infectar seus hospedeiros. Estima-se que mais de vinte e cinco espécies de bactérias Gram-negativas que interagem com outros organismos, como patógenos ou como simbiotes, estão equipados com este sistema especial de transporte de proteínas (Cornelis, G. R., 2006). Este sistema é responsável por injetar proteínas efetoras da bactéria dentro do citosol de células eucarióticas, interferindo na transdução de sinais das células hospedeiras, desarmando a resposta imune e resultando na criação de um nicho celular para o estabelecimento e colonização da bactéria no interior do organismo (Hueck, 1998). Algumas proteínas da estrutura basal do T3SS de *Xanthomonas* são conservadas na

maioria das bactérias patogênicas de animais, tais como *Yersinia* spp., *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* enteropatogênica e *Chlamydia* spp. e fitopatógenos como *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* spp., *R. solanacearum*, *Xanthomonas campestris* e *Rhizobium* spp. (Hueck, 1998; Aizawa, 2001; Cornelis, Guy R., 2006; Buttner, 2012).

Diversos trabalhos de expressão gênica em *Xac* (Facincani et al., 2014, Mendoza, 2016, Hueck, 1998) demonstram que o T3SS é regulado em respostas a estímulos ambientais, podendo em determinadas situações serem reprimidos ou ativados através de fatores de transcrição (Koebnik et al., 2006; Buttner e Bonas, 2010). Alguns estudos ainda demonstram que quando a *Xac* é inoculada em citros, os genes do T3SS são os primeiros a serem expressos nos estágios iniciais da doença (Facincani et al., 2014; Jacob et al., 2014), fornecendo mais uma evidência da importância deste sistema para o início do desenvolvimento do cancro.

Para injetar proteínas efetoras dentro da célula do hospedeiro, um aparato do T3SS denominado injectossoma (ver item 2.2.1) é montado formando duas estruturas: uma base cilíndrica ancorada nas membranas interna e externa da bactéria, denominada de estrutura basal; e um filamento helicoidal denominado pilus Hrp, que é inserido nesta estrutura basal (Figura 1). Estas duas estruturas acopladas permitem o transporte de proteínas através de um caminho contínuo e direto para que os efetores se movam do citoplasma bacteriano para o citoplasma do hospedeiro (Yip e Strynadka, 2006). Embora haja uma similaridade estrutural entre as proteínas do injectossoma nos diversos gêneros bacterianos, as proteínas secretadas por este sistema (efetores), variam muito em tamanho, estrutura e função de acordo com o tipo de bactéria (Hueck, 1998; Anderson e Schneewind, 1999; Galan e Collmer, 1999).

O T3SS de *Xanthomonas* é formado por componentes proteicos que podem ser subdivididos em quatro categorias: aparato de secreção ou injectossoma, chaperonas, efetores e reguladores de transcrição (Yan e Wang, 2012). Estes grupos serão descritos com maiores detalhes nos tópicos seguintes.

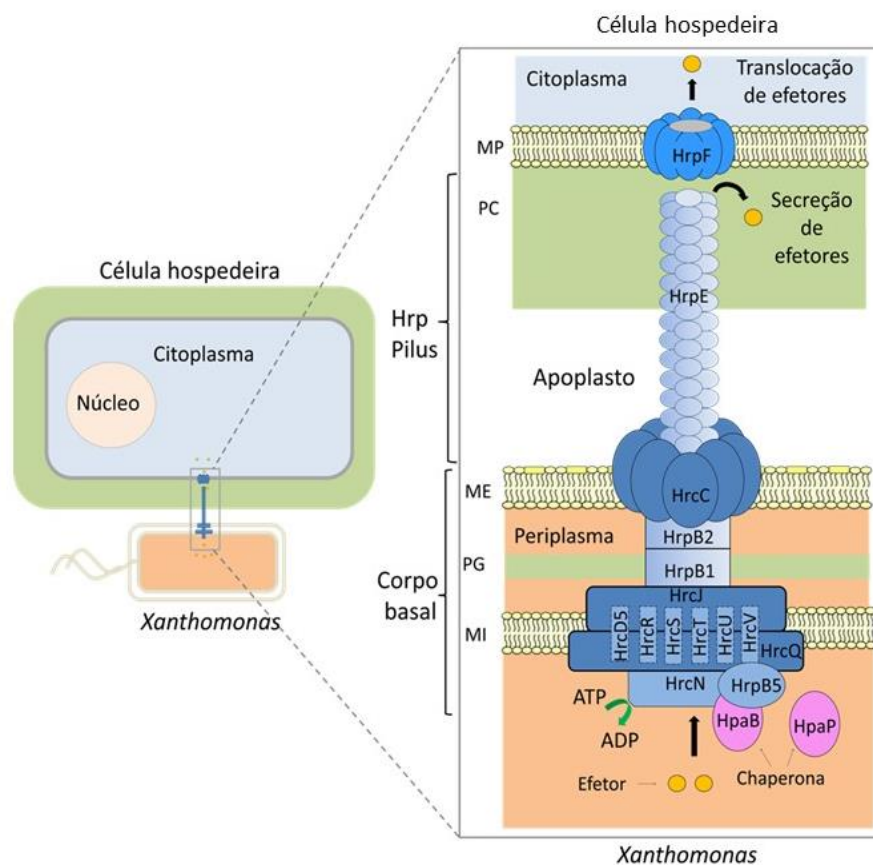


Figura 1 - Modelo da estrutura do aparato do T3SS das bactérias do gênero *Xanthomonas*. Os principais componentes funcionais do aparato T3SS descritos neste modelo são injectossoma, efetores, chaperonas e reguladores. Fonte: Mendoza (2016).

2.2.1 Injectossoma

O injectossoma em *Xanthomonas* pode ser também denominado aparato de secreção do tipo III e já foi identificado na maioria dos patógenos vegetais tais como *P. syringae*, *Xanthomonas spp.*, *R. solanacearum*, e *Erwinia spp* (Buttner e Bonas, 2006; Mccann e Guttman, 2008). Este aparato contém vários componentes proteicos e estruturais que podem ser subdivididos em categorias. Geralmente, nas bactérias Gram-negativas este conjunto é constituído por mais de 20 proteínas diferentes. Em *Xac*, este sistema é codificado por um conjunto de 25 genes localizados no *locus hrp* (hypersensitive response and pathogenicity), que são assim chamados por serem necessários para causar doença em plantas suscetíveis e para induzir respostas de hipersensibilidade em plantas resistentes (Lindgren *et al.*, 1986). Esta resposta de hipersensibilidade produz sintomas como morte celular no local e lesões necróticas, levando à contenção do patógeno no sitio de infecção (Mur *et al.*, 2008; Oh *et al.*,

2008). Os genes *hrp* são necessários para a síntese do aparato e também para a translocação das proteínas até as células vegetais (Huguet *et al.*, 1998; Rossier *et al.*, 1999). O aparato, quando montado, pode ser subdividido em anel da membrana interna, anel da membrana externa, pilus Hrp, translocadores e ATPase (ver abaixo).

Anel de membrana interna - O primeiro aparato proteico do injectossoma a ser montado é o anel de membrana interna. Esta estrutura é constituída por pelo menos três proteínas que englobam a membrana interna, o periplasma e o citoplasma bacteriano. Este anel interno é funcionalmente semelhante ao corpo basal flagelar bacteriano, que tem a função em ambos os sistemas de servir como base para a montagem das estruturas (tanto o flagelo quanto o injectossoma) (Yip e Strynadka, 2006). Uma proteína importante que faz parte do anel de membrana interna é a HrcV, que consiste em oito hélices transmembranas e uma região citoplasmática (denominada HrcVC). Estudos revelam que HrcVC é essencial para que esta proteína se ligue aos substratos do injectossoma, incluindo a proteína formadora do pilus (HrpE), e proteínas efectoras. (Hartmann e Buttner, 2013). Outra proteína que está relatada em fazer parte do anel de membrana interna é a HrcJ, que interage com HrcV e com HrcC, possivelmente ligando as membranas interna e externa do T3SS em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Wen-Xiang *et al.*, 2010). Além destas, estudos no fitopatógeno *X. campestris* pv. *vesicatoria* predizem outras cinco proteínas que fazem parte da estrutura da membrana interna: HrcD, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU. Este estudo verificou também que estas proteínas são conservadas em outros organismos, como por exemplo na bactéria *Yersinia* (Berger *et al.*, 2010).

O anel de membrana externa – O anel de membrana externa é composto por apenas um componente proteico, a secretina. (Yip e Strynadka, 2006). A família das secretinas são amplamente dispersas em muitas bactérias Gram-negativas, e fazem parte de vários outros sistemas, além do T3SS, como no transporte e secreção do tipo II, IV e outros. (Thanassi e Hultgren, 2000). Esta estrutura de anel externo forma um canal (ou poro) e possui a função de ancoragem e estabilização do pilus. Entretanto, esta estrutura não tem a capacidade de mediar diretamente a transdução das proteínas efectoras (esse anel não consegue injetar as proteínas), estando este anel apenas envolvido com a estabilidade da agulha do injectossoma (Yip e Strynadka, 2006). Em *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi revelado que a proteína HrpA é a secretina

que está localizada na membrana externa (Wengelnik, Marie, *et al.*, 1996). Este anel, diferentemente do anel de membrana interna, não compartilha homologia com o sistema flagelar (Yip e Strynadka, 2006).

O pilus - O pilus Hrp é a estrutura helicoidal que confere o formato de agulha (ou tubo) do injectossoma, fornecendo um canal de transporte de proteínas através da interface hospedeiro-patógeno. Foi observado que o pilus em patógenos de plantas são mais longos do que nas bactérias patogênicas de animais, provavelmente pelo fato de que a parede celular de plantas é mais espessa do que a membrana celular animal, constituindo um obstáculo maior para transportar as proteínas efetoras entre bactérias patogênicas e seus hospedeiros (Buttner e He, 2009). O componente principal do pilus que é exclusivo do gênero *Xanthomonas*, é a proteína HrpE, de aproximadamente 9 kDa. HrpE forma um pilus delgado de 8-10 nanômetros de diâmetro e até 4 micrômetros de comprimento. Mutações no gene *hrpE* fazem com que a bactéria perca a capacidade de induzir a doença nas plantas suscetíveis e resposta de hipersensibilidade nas plantas resistentes. Por isto, HrpE é considerada essencial para o funcionamento do T3SS (Weber e Koebnik, 2005).

Apesar do pilus ser composto basicamente apenas pela proteína HrpE, sua estrutura depende da proteína HrpB2, pois estudos de microscopia eletrônica relevaram que a HrpB2 localizada no periplasma atua como base para inserção do pilus (Hartmann *et al.*, 2012). Outros estudos em *X. campestris* pv. *vesicatoria* demonstram que além de HrpB2, a proteína HrpB1 também auxilia nestes processos, e juntas elas formam um complexo no periplasma se associando com a membrana interna e externa do T3SS. (Hausner *et al.*, 2013).

Os translocadores - Apesar do pilus Hrp formar um caminho contínuo até o citosol do hospedeiro, ele não é capaz de injetar as proteínas efetoras dentro da célula. Portanto, as cepas que não possuem as proteínas translocadoras conseguem secretar a proteína efetora, mas são incapazes de injetá-las nas células-alvo. Em outras palavras, somente a “agulha” é insuficiente para mediar a translocação (Sory e Cornelis, 1994). Para a correta translocação de efetores, o pilus Hrp é ancorado no poro que é formado pelas proteínas translocadoras, e assim é feita a “entrega” direta das proteínas efetoras na célula hospedeira. Uma dessas estruturas, recentemente identificada em *Yersinia enterocolitica*, é formada por uma única proteína, LcrV

(Mueller *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2017). Em trabalhos realizados em *X. campestris* pv. *Vesicatoria*, foi verificado que a proteína HrpF funciona como translocadora, se unindo à bicamada lipídica da célula vegetal, formando poros na membrana vegetal e possibilitando a translocação das proteínas para dentro da célula hospedeira. Foi visto também nestes estudos que ela é necessária para a interação planta-patógeno, porém dispensável para a secreção dos efetores do T3SS (Rossier *et al.*, 2000; Buttner *et al.*, 2002).

ATPase - As ATPases são envolvidas em uma grande variedade de processos biológicos. No sistema T3SS, uma ATPase é encontrada na membrana interna da célula bacteriana (Pozidis *et al.*, 2003) e possui a propriedade de interagir com as chaperonas (descrita no tópico 2.3.2) e com as proteínas efetoras (tópico 2.3.3). Estas interações resultam na dissociação de complexos proteicos e no desdobramento do domínio efetor das proteínas efetoras para que estas se insiram no pilus e sejam translocadas. De maneira geral, a ATPase é necessária para dar energia via hidrólise do ATP ao processo de secreção dos efetores desempenhando papel de recrutadora e selecionando corretamente os efetores a serem translocados (Galán e Wolf-Watz, 2006).

2.2.2 Chaperonas

Quando a bactéria detecta um ambiente com baixa disponibilidade nutricional (como no apoplasto), ocorre a ativação da expressão dos genes do T3SS e, por consequência, uma grande quantidade de proteínas efetoras é produzida. Entretanto, esta grande quantidade de proteínas não é rapidamente translocada para as células vegetais; elas permanecem armazenadas no citoplasma bacteriano associadas a outras proteínas chamadas de chaperonas até serem translocadas. As chaperonas previnem possíveis interações dos efetores com outras proteínas durante o tempo de armazenamento no citoplasma bacteriano (Page e Parsot, 2002).

As chaperonas no gênero *Xanthomonas* também auxiliam na montagem e homeostase do T3SS, direcionando os efetores até o aparato de secreção (Wattiau *et al.*, 1994; Feldman e Cornelis, 2003). Para isso, as chaperonas se ligam aos efetores pelo domínio CBD (domínio de ligação às chaperonas) que fica localizado nos 100 primeiros aminoácidos da proteína efetora (Wattiau *et al.*, 1994; Feldman e

Cornelis, 2003; Cornelis, Guy R., 2006). A ausência destas proteínas resulta na falta de secreção dos efetores. Tal fato foi verificado na bactéria *X. oryzae* pv. *oryzae* onde foi visto que quando há mutações nas chaperonas HpaB e HpaC, a bactéria perde a capacidade de secreção (Feldman e Cornelis, 2003; Furutani *et al.*, 2009).

As chaperonas podem ser subdivididas em três classes. A classe I é a principal de patógenos de plantas, e reconhece um ou vários efetores e já foram descritas no gênero *Pseudomonas* e *Erwinia* (Gaudriault *et al.*, 1997; Van Dijk *et al.*, 2002). A classe II são as chaperonas que auxiliam na formação de poros na membrana, e a classe III está relacionada com as chaperonas do sistema flagelar (Wattiau *et al.*, 1994; Parsot *et al.*, 2003; Cornelis, Guy R., 2006).

2.2.3 Efetores

As proteínas efetoras são injetadas nas células vegetais através do T3SS, acarretando na patogenicidade nas plantas suscetíveis, e causando resposta de hipersensibilidade nas plantas resistentes. Em *Xanthomonas* e nas fitobactérias Gram-negativas de forma geral, cerca de 25 proteínas efetoras diferentes são injetadas no interior das células vegetais. Suas funções são diversificadas e desempenham um importante papel na interação planta-patógeno (Kay e Bonas, 2009). Apesar de diversos domínios proteicos serem conservados entre diferentes espécies, a função específica da grande maioria dos efetores de T3SS ainda não foi elucidada (Kay e Bonas, 2009).

Em *R. solanacearum* e *Xanthomonas*, foi identificado os efetores da família TAL (transcription activator-like), que induzem diretamente a expressão de genes das células vegetais, podendo contribuir para a multiplicação bacteriana no ambiente apoplástico, desenvolvendo os sintomas do cancro e ainda auxiliando na sobrevivência epifítica (Gurlebeck *et al.*, 2006). Até o momento, poucos efetores responsáveis pela supressão das respostas de defesa das plantas são conhecidos. Porém estudos em *X. campestris* pv. *vesicatoria* verificaram que os efetores XopX são capazes de suprimir as reações de defesa da planta e ajudam a aumentar as lesões da doença (Metz *et al.*, 2005; Kay e Bonas, 2009). E um outro estudo foi demonstrado que alguns membros da família AvrBs3 conferem a agressividade e virulência da *Xanthomonas*, sendo que estes ainda são capazes de suprimir a indução

das respostas de defesa da planta (resposta de hipersensibilidade) (Fujikawa *et al.*, 2006).

2.2.4 Reguladores

As proteínas reguladoras atuam controlando a expressão dos genes do T3SS através da percepção nutricional no meio em que bactéria se encontra. Portanto, os genes do T3SS são induzidos provavelmente por múltiplas vias de transdução de sinais. Quando há escassez de nutrientes no ambiente, a bactéria ativa a expressão do T3SS e quando há abundância de nutrientes estes genes são reprimidos (Tang *et al.*, 2006).

De maneira mais específica, os genes do regulon *hrp* são os responsáveis pela expressão de constituintes estruturais do T3SS. A expressão do regulon *hrp* é controlada principalmente pelos reguladores, HrpG e HrpX. A proteína HrpG é um regulador de transcrição pertencente à família OmpR, responsável pela ativação da expressão de HrpX e HrcC em *Xanthomonas*. A proteína HrpX é uma outra ativadora de transcrição que controla a expressão de diversos outros genes do regulon *hrp*. (Wengelnik, Van Den Ackerveken, *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2011). Estima-se que juntos, HrpG e HrpX regulam cerca de 24 genes estruturais e 23 genes efetores do T3SS (Guo *et al.*, 2011). Além do T3SS, esses genes regulam também alguns genes do sistema de secreção do tipo II (Guo *et al.*, 2011).

Apesar da importância de HrpG para a indução do T3SS e conseqüentemente para o início da virulência bacteriana, não são conhecidos qual ou quais os estímulos que o ativam. Apenas se tem conhecimento de que HrpG é uma proteína da família das RR de um TCS componentes. O TCS é composto por duas proteínas: uma HK e uma RR. A HK é responsável por captar sinais extracelulares, se autofosforilando e transferindo o grupo fosfato para a sua respectiva RR, levando a ativação do regulon *hrp* (Figura 2). (Wengelnik, Marie, *et al.*, 1996; Alegria *et al.*, 2004).

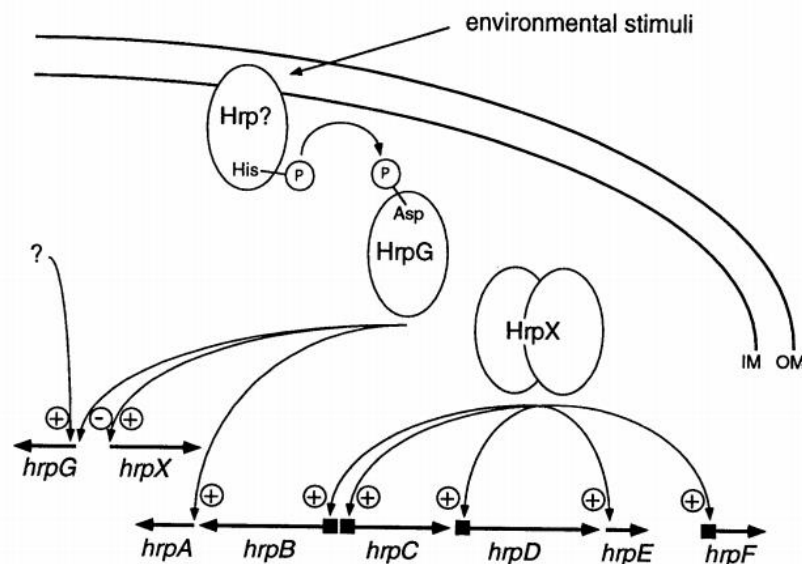


Figura 2 - Esquema da regulação do T3SS por HrpG e HrpX, evidenciando captação de um estímulo ambiental (desconhecido) e as interações entre uma HK ainda não identificada (Hrp?) e a RR HrpG. Quando fosforilada, HrpG leva a expressão de HrpX que por sua vez ativa a expressão de outros genes do regulon *hrp*. Fonte: Wengelnik, Marie *et al.* (1996)

2.3 O sistema de dois componentes

Os organismos vivos possuem a capacidade de identificar alterações do ambiente e captar sinais extracelulares para se adaptarem ao meio. As bactérias, utilizam vias de sinalização denominadas sistema de transdução de sinal ou TCS (West e Stock, 2001). O TCS atua na transdução de sinais em resposta a estímulos ambientais, tais como limitação nutricional, alterações de pH, osmolaridade ou presença de toxinas (Mitrophanov e Groisman, 2008). Estes sistemas são compostos por proteínas que ajudam as bactérias e fungos a sobreviverem no meio ambiente, e por isto são consideradas promissoras para novas pesquisas antimicrobianas (Wang, C. *et al.*, 2013).

Os TCSs de procariotos são compostos por uma proteína HK que capta os sinais extracelulares e os transmite para as vias intracelulares, e uma proteína RR que é responsável pela regulação de genes específicos (Figura 3) (Lamarche *et al.*, 2008; Crepin *et al.*, 2011). A transdução de sinal ocorre quando a HK, localizada na região transmembrana, autofosforila-se e transfere um grupo fosfato para sua respectiva RR, que por sua vez, leva as bactérias a se reprogramarem rapidamente, alterando a transcrição de genes alvo (Stephenson e Hoch, 2002; Wang, C. *et al.*, 2013). Apesar

destes sistemas serem necessários para a adaptação bacteriana, há estudos que indicam que os TCSs não são essenciais para sobrevivência dos microrganismos (Grebe e Stock, 1999). Nos tópicos seguintes serão abordados as estruturas e funções de cada um dos componentes do TCS.

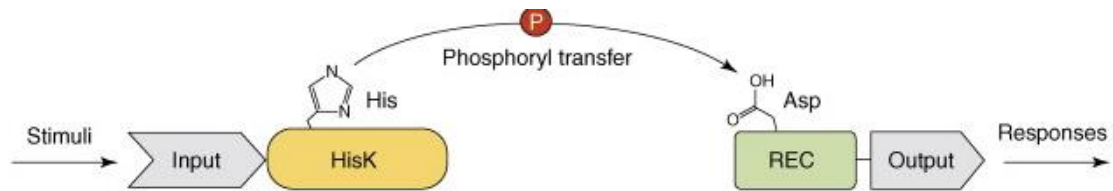


Figura 3 - Diagrama esquemático de um TCS. Um estímulo ambiental é captado, a HK (HisK) em amarelo autofosforila-se e transfere um grupo fosfato para a proteína REC em verde. Fonte: Gao *et al.* (2007).

2.3.1 Histidina quinase

A maioria das HKs são proteínas ligadas a membrana com um domínio de detecção periplasmático (N-terminal) ligado a um domínio citoplasmático (C-terminal). Os domínios sensores podem ser variáveis de acordo com a HK, refletindo na captação de diversos sinais ambientais diferentes dos quais as HKs são responsáveis (West e Stock, 2001).

A primeira HK para a qual informação estrutural tornou-se disponível para toda a porção citoplasmática foi obtida pelo estudo do micro-organismo *T. maritima* (Marina *et al.*, 2005). Estudos mais recentes relataram a estrutura cristalina da HK do patógeno *Streptococcus mutans* (Figura 4) (Wang, C. *et al.*, 2013). Neste estudo foram descritos a região citoplasmática completa da HK Vick e suas respectivas funções. O domínio PAS tem a função sensora na maioria das HKs, e é capaz de responder a alterações no potencial redox, na concentração de oxigênio e luminosidade, e à presença de moléculas no ambiente. Alterações ou mutações neste domínio podem afetar a estabilidade de toda a HK (Ponting e Aravind, 1997; Moglich *et al.*, 2009; Wang, Chen *et al.*, 2013; Wang, C. *et al.*, 2013). Já o domínio HAMP é o responsável pela mediação da transdução de sinais transmembrana (Albanesi *et al.*, 2009; Parkinson, 2010). O domínio de ligação do ATP (denominado domínio CA) juntamente com a porção C-terminal da HK são as regiões responsáveis por fosforilar um resíduo de histidina no

meio das hélices denominadas domínio DHp; o sítio ativo da HK está presente nestes dois últimos domínios citados (DHp + CA) (Wang, C. *et al.*, 2013).

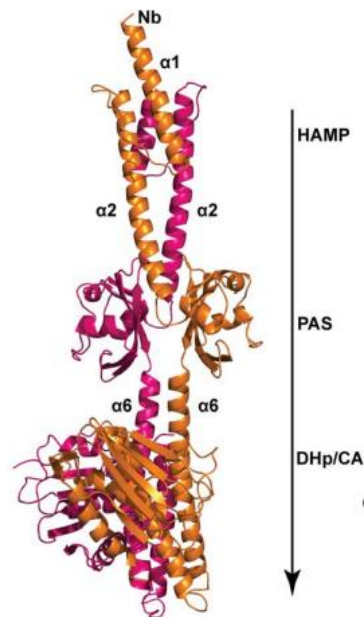


Figura 4 - Estrutura geral da HK VicK de *S. mutans* e seus domínios HAMP, PAS, DHp/CA correspondentes. Fonte: Wang, Chen. *et al.* (2013).

2.3.2 Regulador de resposta

Os RRs funcionam como interruptores moleculares que são controlados pela atividade das HKs. Essa ativação ocorre quando uma proteína HK se autofosforila e transfere o grupo fosfato para um resíduo de ácido aspártico (Asp) no respectivo RR. A fosfotransferência da HK para o RR resulta na ativação do RR e na geração da resposta na via de sinalização. Estas proteínas geralmente possuem uma estrutura de dois ou mais domínios, com um domínio regulador N-terminal conservado (também denominado domínio receptor) e um domínio efetor C-terminal variável. Os domínios reguladores dos RRs interagem com as HKs fosforiladas, catalisam a transferência de um grupo fosfato para um dos seus próprios resíduos de Asp, e catalisam a própria autofosforilação. A autofosforilação deste domínio acarreta na ativação do domínio efetor que, por sua vez, induz uma resposta específica (podendo ser transcrição de genes específicos ou interações com outras proteínas) (West e Stock, 2001). O domínio efetor variável das RRs permite que os RRs funcionem como adaptadores moleculares, ativados por fosforilação que associam uma ampla variedade de comportamentos celulares a estímulos ambientais (Rong Gao 2007). Na maioria dos

sistemas procarióticos, o RR ativado atua como um fator de transcrição (West e Stock, 2001).

2.3.3 Relação do T3SS com o TCS PhoR/PhoB

O fosfato inorgânico (Pi) é um nutriente de grande importância para o crescimento e desenvolvimento bacteriano (Lamarche *et al.*, 2008). Nas bactérias, o mecanismo utilizado para detectar e transportar o Pi extracelular é controlado pelo TCS PhoR/PhoB (Lamarche *et al.*, 2008; Hsieh e Wanner, 2010). Este controla a expressão do regulon *pho* nas bactérias em resposta às concentrações de Pi presentes no ambiente. Quando as bactérias se multiplicam em condições limitadas de Pi, a proteína PhoR fosforila a PhoB que, por sua vez, ativa a expressão dos genes do regulon *pho* (Lamarche *et al.*, 2008). Diversos estudos já demonstraram uma possível relação entre o regulon *pho* e a virulência de *Xac* (Jacobsen *et al.*, 2008; Lamarche *et al.*, 2008; Crepin *et al.*, 2011); porém, apenas poucos estudos, realizados principalmente com patógenos de animais, relacionam o regulon *pho* com a regulação dos genes do T3SS (Rao *et al.*, 2004; Chakraborty *et al.*, 2011; Chekabab *et al.*, 2014). PhoB e o regulador HrpG fazem parte da mesma família de proteínas, ambas sendo RR de um TCS. Porém, enquanto a HK PhoR é quem fosforila e ativa PhoB, em um sistema já descrito em diversas espécies de bactérias, ainda não se tem conhecimento de qual HK interage com o RR órfão HrpG.

Em um estudo previamente realizado por Mendoza (2016) utilizando técnicas de RNA-Seq e real time-PCR com *Xac*, foi demonstrado que altas concentrações de Pi suprimem significativamente a expressão do T3SS (Figura 5), indicando uma possível relação entre PhoR/PhoB e o desencadeamento do Cancro Cítrico (Mendoza, 2016).

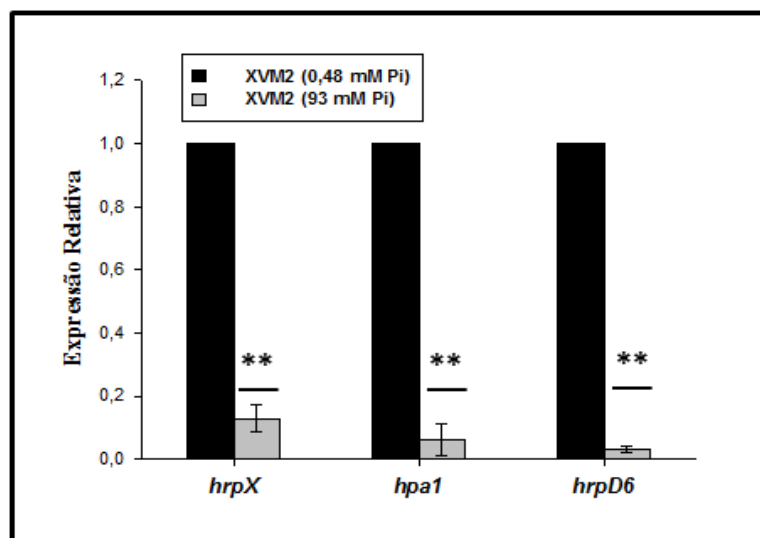


Figura 5 - Efeito do Pi sobre a expressão de três genes do T3SS em *Xac* no meio de cultura XVM2. O meio XVM2 normal (representado pela coloração escura) com baixa concentração de Pi, simulando as condições que a *Xac* encontra *in planta*, acarretou na superexpressão do T3SS. No meio XVM2 com altas concentrações de Pi é demonstrado que há uma drástica diminuição da expressão dos genes de T3SS (representado pela coloração clara) Fonte: Mendoza (2016).

Foi então levantada a hipótese de que PhoR fosse o receptor HK também de HrpG. Análises preliminares de interação física *in silico* entre PhoR e HrpG foram efetuadas por meio de modelagem molecular. Apesar da estrutura cristalográfica de HrpG de *Xac* ainda não ter sido descrita, sua modelagem foi realizada com relativo sucesso devido à alta similaridade de sequência de aminoácidos que esta compartilha com PhoB, cuja estrutura está disponível nos bancos de dados públicos. As modelagens sugerem que o receptor PhoR poderia de fato interagir com HrpG e possivelmente usar o mesmo mecanismo de fosforilação de PhoB para fosforilar HrpG (Figura 6). Portanto, este poderia ser um dos mecanismos moleculares de regulação e ativação da expressão dos genes do T3SS, acarretando no início do desenvolvimento do Cancro Cítrico.

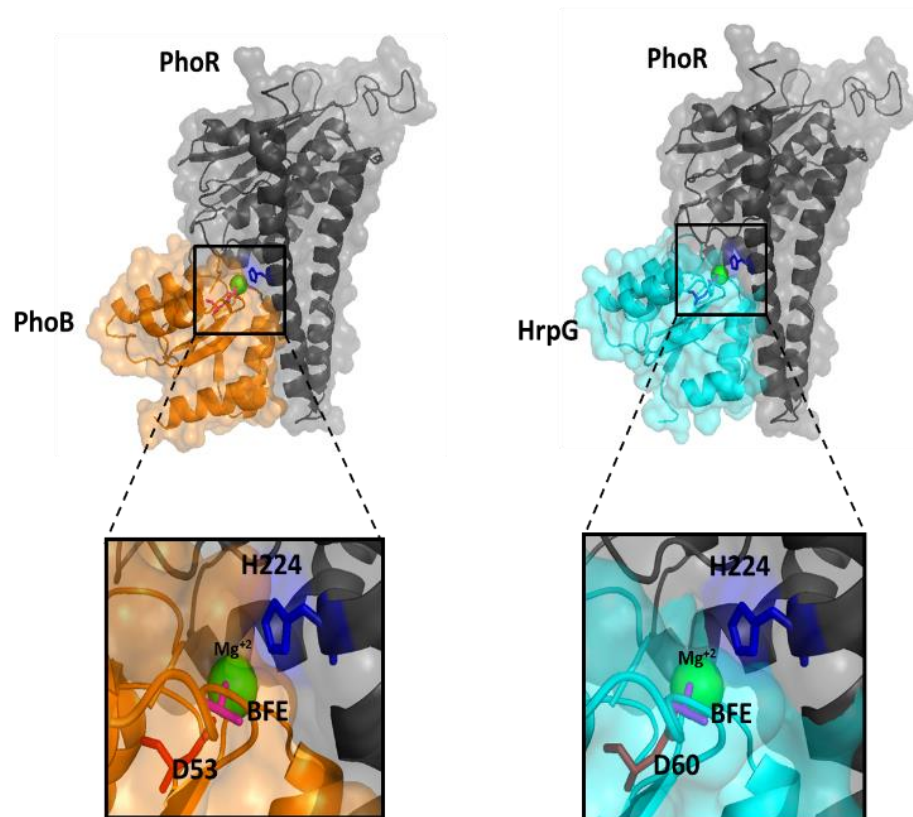


Figura 6 - Modelagem molecular das proteínas PhoR, PhoB e HrpG de *Xac*. Regiões modeladas em PhoR, PhoB e HrpG que poderiam estar envolvidas no processo de fosforilação são mostradas em destaque. Os modelos estruturais foram gerados no servidor on-line Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>). O programa utilizado para a visualização gráfica de todas as estruturas tridimensionais foi o PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) Fonte: Mendoza (2016).

Partindo-se do princípio de que não é conhecida nenhuma forma eficaz de controle e eliminação do Cancro Cítrico, acarretando em grandes perdas econômicas para o Brasil e para mundo, torna-se indispensável a necessidade de estudos que elucidem os mecanismos iniciais da expressão do T3SS, já que o mesmo é o principal fator de virulência em *Xac*. Além de ser um mecanismo chave em *Xanthomonas*, é conhecido que esses mecanismos são conservados em outras bactérias patogênicas. Dessa forma, se a hipótese de que PhoR fosforila tanto PhoB quanto HrpG for confirmada, novas alternativas poderão ser desenvolvidas como formas de controle e erradicação, não apenas para o Cancro Cítrico, como também para o controle de outros patógenos que utilizam do mesmo sistema de secreção.

2.4 Expressão Heteróloga de Proteínas

As proteínas são moléculas essenciais para os processos biológicos. O entendimento de suas funções e interações podem gerar diversos avanços na área biotecnológica. Uma das formas de se detectar as funções proteicas é purificando-as e analisando sua estrutura, atividade e interações físicas com outras moléculas (Nelson; Cox, 2011).

Em organismos em que as proteínas de interesse são pouco expressas, comumente são utilizadas as técnicas de expressão heteróloga para se obter material suficiente para estudos. Esta técnica utiliza principalmente a tecnologia de DNA recombinante para inserir o gene codificador da proteína de interesse em outros organismos (geralmente bactérias) que normalmente não a produziram, com a finalidade de produção em larga escala da proteína de interesse (Vieira, 2004). Esta técnica é bastante utilizada para produção de novos medicamentos, baseados na obtenção de proteínas que possuem ação terapêutica (Angov *et al.*, 2011).

Um dos organismos mais utilizados para expressão heteróloga de proteínas é a bactéria *E. coli* devido ao vasto conhecimento da genética e fisiologia deste organismo, além da facilidade de manuseio e armazenamento, e tempo de crescimento aliado à sua relativa simplicidade molecular (Hunt, 2005). Entre as linhagens de *E. coli* mais utilizadas está a BL21, pois ela apresenta rápido crescimento, e não oferece riscos ao manuseio. Além destas características ela ainda possui ausência de algumas proteases que poderiam degradar e interferir durante o processo de purificação das proteínas de interesse (Sorensen e Mortensen, 2005). Além do organismo, são ainda necessários a correta escolha dos sistemas de expressão, que em bactérias são plasmídeos que podem induzir a expressão das proteínas heterólogas.

Um sistema de expressão disponível e comumente utilizado é o *The Champion*® pET SUMO (Invitrogen). Este sistema utiliza o gene da RNA polimerase retirado do bacteriófago T7, para potencializar a expressão dos genes heterólogos que forem inseridos neste vetor. A indução do sistema T7 é realizado através da presença do composto isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Hunt, 2005; Samuelson, 2011). O pET SUMO adiciona à proteína recombinante uma calda de histidina (6xHis) na porção N-terminal, e uma região SUMO que auxilia na solubilidade da proteína recombinante. A calda His pode ser utilizada posteriormente para purificações em coluna de afinidade (como a de Níquel ou Zinco). Normalmente, a presença de vários

resíduos de histidina nas extremidades das proteínas é incomum, portanto, a cauda pode ser utilizada para auxiliar nos processos de purificação (Gaber-porekar, 2001).

2.5 Purificação de Proteínas

Partindo-se do fato de que as células possuem uma grande diversidade de proteínas, diversas técnicas ao longo dos anos foram desenvolvidas a fim de facilitar o processo de purificação. Atualmente existem os métodos clássicos, que visam se apropriar das características naturais de cada proteína (tamanho, carga, e propriedades de ligação) para a separação eficiente das mesmas, e também os métodos modernos que contam com clonagem de DNA, sequenciamento e expressão heteróloga de proteínas (Nelson; Cox, 2011). Ambos os métodos têm como objetivo produzir a proteína de interesse com alta eficiência e produtividade, e podem ser usados em combinação.

Em um processo de purificação de proteínas, é preciso que conformação nativa e as atividades das proteínas sejam mantidas. Tendo em vista esses objetivos, uma técnica muito utilizada e considerada como um dos melhores métodos de purificação é a cromatografia de afinidade. Para realizar a cromatografia de afinidade, é necessário que a proteína tenha afinidade a algum ligante que esteja fixado na coluna (fase estacionária). Desta forma a separação das proteínas de interesse ocorre com considerável seletividade. Uma das estratégias que tem sido utilizada para a purificação de proteínas heterólogas por coluna de afinidade é a utilização de caudas de histidina (His) associadas as proteínas. Essas caudas adicionadas nas extremidades das proteínas recombinantes, exibem afinidade para metais como zinco (Zn) e níquel (Ni), que se encontram fixados na coluna (Saraswat et al., 2013). Estima-se que este processo pode promover a retirada de mais de 90% das proteínas contaminantes.

O processo de purificação por coluna de afinidade pode ser descrito em quatro principais etapas (Roy; Mondal; Gupta, 2007). Primeiramente é necessário que haja um sistema de afinidade que ligue a proteína de interesse a coluna de afinidade. Segundo, a proteína e a coluna precisam ter contato direto, e assim permanecerem fixadas (ligadas através do complexo proteína-ligante). Em terceiro lugar, é necessário que a coluna seja abundantemente lavada para a retirada das proteínas contaminantes e, por fim, o último passo consiste na eluição das proteínas através da

dissociação do complexo proteína-ligante, permitindo a obtenção da proteína de forma pura.

3. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi verificar se a proteína receptora PhoR do TCS PhoR/PhoB de *Xac* interage fisicamente com o regulador máster HrpG. Para isto, os objetivos específicos foram:

- Clonar, expressar e purificar as proteínas recombinantes HrpG, PhoR e PhoB de *Xac* em *E. coli*.
- Realizar ensaios de interação física entre as proteínas recombinantes HrpG e PhoR, e entre PhoB e PhoR (controles).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens

A bactéria *E. coli* DH10B foi utilizada como organismo para amplificação dos vetores recombinantes contendo os genes PhoR, PhoB e HrpG, separadamente. A One Shot® *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) foi utilizada como hospedeira para expressão das proteínas recombinantes HrpG, PhoB e PhoR de *Xac*. As células de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) [10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl, por litro], enquanto as transformantes, quando apropriado, foram cultivadas em meio LB suplementado com canamicina (50 µg / ml).

4.2 Amplificação e Clonagem no Vetor de Expressão

As amostras de DNA utilizadas para as amplificações foram provenientes dos cosmídeos da biblioteca de *Xac* 306 (Da Silva *et al.*, 2002) (cosmídeo 00H06 para o gene HrpG e 00MH03 para os genes PhoR e PhoB), que foram extraídos através do kit “Wizard Plus 96 SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Foi realizada também, a extração do DNA genômico

de *Xac*, utilizando-se o kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega) para testes de ampliações.

Para realizar a clonagem, foi utilizado o vetor pET SUMO (The Champion™ pET SUMO TA Cloning®), o qual direciona a expressão de proteínas recombinantes fundidas na extremidade N-terminal a uma cauda de poli-histidina juntamente com a proteína SUMO, que auxilia na solubilidade. O vetor está na forma linear, não sendo necessária a utilização de enzimas de restrição. Para que o vetor possa se ligar ao fragmento de interesse, ele contém em ambas extremidades um resíduo de timidilato não pareado (5' *overhang*), que se emparelha com um adenilato adicionado pela *Taq* DNA polimerase ao fragmento de PCR. A calda de His e a proteína SUMO adicionam um total de 115 aminoácidos às proteínas recombinantes.

Considerando a modelagem molecular de Mendoza (2016) (Figura 8), as possíveis regiões de interação das proteínas PhoR, PhoB e HrpG foram utilizadas para desenhar oligonucleotídeos específicos para a amplificação de cada região gênica correspondente (Tabela 1). As reações de PCR consistiram de 200 ng de DNA cosmidial, 0,5µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 U de *Taq* DNA polimerase (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Thermo Fisher Scientific), 1X tampão (Buffer CG), 3% de DMSO (Dimethyl sulfoxide) e água ultrapura para um volume final de 20 µL. O termociclador “GeneAmp® Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems)” foi usado, e os ciclos de PCR utilizados foram: desnaturação inicial a 98°C por 30 seg., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 seg., 15 seg. de temperatura de anelamento (66°C para HrpG e 57°C para PhoR e PhoB) e extensão de 72° C por 15 seg., e uma extensão final de 72° C por 10 min. Ao final da reação, adicionou-se 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), seguido de incubação a 72°C por 10 min. para adição do resíduo de adenilato às extremidades do produto de PCR. Os tamanhos esperados dos produtos de PCR foram analisados em gel de agarose e em seguida esses produtos foram purificados com o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”.

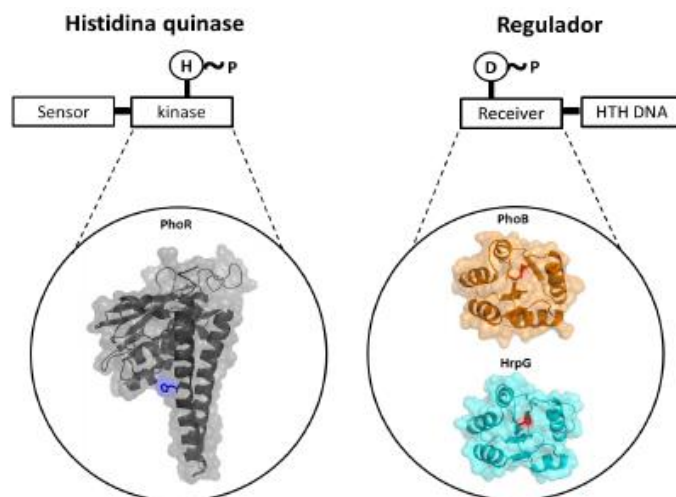


Figura 8 - Modelagem molecular das proteínas PhoR, PhoB e HrpG de *Xac*. Regiões modeladas em PhoR, PhoB e HrpG que estão envolvidas no processo de fosforilação. Fonte: Mendoza (2016).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação parcial dos genes *phoR*, *phoB* e *hrpG*.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5'→3'	“Amplicon” (pb)
PhoR <i>Forward</i>	GATGTCAGCAAGCTGCTG	693
PhoR <i>Reverse</i>	CGGTACGAAATGACACGAGAA	
PhoB <i>Forward</i>	AAACGCATTCTGATCGTC	360
PhoB <i>Reverse</i>	GGTGCGCCGCATCACCGC	
HrpG <i>Forward</i>	GCCGGATCGGTGTTCTG	363
HrpG <i>Reverse</i>	ATGCGCCACCGGCGATAT	

Os diferentes produtos de PCR foram ligados individualmente no vetor de expressão pET SUMO (Invitrogen). Para as ligações dos insertos utilizou-se: 1 µL de tampão de ligação (10X, Invitrogen), 100 ng dos produtos de PCR, 100 ng de vetor, 1 µL de T4 DNA ligase (2 U/µL, Invitrogen), e água ultrapura para um volume final de 10 µL. As ligações foram mantidas a 15°C por 16 horas, obtendo-se assim as construções His-SUMO-PhoR, His-SUMO-PhoB e His-SUMO-HrpG.

4.3 Transformação Bacteriana e Seleção dos Clones

As construções His-SUMO-PhoR, His-SUMO-PhoB e His-SUMO-HrpG foram utilizadas para transformação em células de *E. coli* DH10B termocompetentes. Para

as transformações, 3 µL de cada uma das ligações (His-SUMO-PhoR, His-SUMO-PhoB e His-SUMO-HrpG) foi adicionado em 50 µL de células termocompetentes de *E. coli* DH10B, incubadas 30 min no gelo, seguidos por 2 min a 42°C em banho-maria e inseridas novamente no gelo. Após o choque térmico, ao tubo, adicionou-se 1 mL de meio SOC (40 µL de glicose 20% e 40 µL de cloreto de magnésio 1 M em meio SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,58 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, pH 7,5 para 1 L)) e incubou-se a 37°C, por 1h sob agitação de 250 rpm. Foram plaqueados 100 e 200 µL de células em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani, LB (10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl em 1 L) contendo 50 µg/mL de canamicina, incubados a 37°C por 16h, para a formação de colônias isoladas.

Para selecionar as colônias transformadas com a construção na orientação correta, foram feitas PCRs de colônia utilizando o primer *Forward* dos genes de interesse (*hrpG*, *phoR* e *phoB*) e o primer *Reverse* do vetor, cuja sequência é 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'. As PCRs de colônias foram realizadas utilizando uma colônia isolada, previamente crescida em placa de Petri contendo LB adicionada de canamicina 50 µg/mL. Uma massa da colônia foi coletada por um palito estéril e transferida para um tubo de PCR, posteriormente foi adicionado ao tubo 20µl de tampão de lise (50mM KCl, 0,1 Tween 20, 10 mM tris HCl, pH 8.8). Os tubos foram incubados no termociclador "GeneAmp® Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems)" durante 30 min a 99°C para a lise eficiente das membranas celulares e exposição do material genético. Após esta etapa 4 µL desta amostra foi utilizada como DNA *template* para as reações de PCR de colônia. As amplificações foram analisadas em gel de agarose 1%.

As reações de PCR de colônia consistiram de 4µL do lisado total, 12,5 uL do Buffer comercial GoTaq® Green Master Mix, 1µM de cada oligonucleotídeo (*Forward* e *Reverse*), e água ultrapura para um volume final de 20 µL. O termociclador "GeneAmp® Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems)" foi utilizado, e os ciclos de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg., 30 seg de temperatura de anelamento (58°C para HrpG e 49°C para PhoR e PhoB) e extensão de 72° C por 30 seg., e uma extensão final de 72° C por 5 min.

Após a confirmação da inserção correta dos genes pelas PCRs de colônia, os plasmídeos foram então extraídos com o kit "Wizard Plus SV Minipreps DNA

Purification System” (Promega), submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger para confirmar a integridade das sequências, utilizando o primer *Forward* e *Reverse* do vetor (Forward 5´-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3´ e Reverse 5´-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3´) e então os vetores com a sequência correta foram introduzidos em células de *E. coli* BL21 através de transformação por choque térmico com o mesmo protocolo realizado para transformação em DH10B.

4.4 Preparação de células termocompetentes das estirpes de *E. coli* DH10B e *E. coli* BL21

Ambas as estirpes, DH10B e BL21 foram preparadas para se tornarem termocompetentes, segundo o protocolo de Sambrook *et al.* (1989) com alterações. As estirpes foram plaqueadas por esgotamento em placas de Petri contendo meio LB, mantidas a 37°C por 16 horas em BOD. Após período de crescimento, uma colônia isolada de cada estirpe foi incubada em 5 mL de meio LB líquido e mantido sob agitação a 200 rpm a 37°C por 16 horas no equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker”. Após o crescimento, uma alíquota de 1 mL deste material foi transferido para um frasco contendo 300mL de meio LB líquido, e mantidos sob agitação a 200 rpm a 37°C até atingir a DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6.

Após a amostra atingir a DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6, o frasco contendo os 300 mL de cultura foi transferido para um banho com água e gelo durante 30 min, para estabilização do crescimento bacteriano. Em seguida, esta amostra foi dividida em seis tubos tipo “Falcon” estéreis e gelados, e estas amostras foram centrifugados a 4°C 3450 g por 12 min. O sobrenadante foi descartado. Em seguida foi adicionado aos precipitados 10 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂ 0,1M e glicerol 20% previamente gelado e estéril). O precipitado de cada tubo foi ressuspenso nesta solução com o auxílio de uma pipeta de volume máximo de 1mL. Após dissolver todo o precipitado, novamente as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Esta etapa de adição de 10 mL de solução de cloreto de cálcio e centrifugação, foi realizada duas vezes.

Após as duas etapas de centrifugação, os precipitados foram unidos em um só tubo do tipo “Falcon” e ressuspendidos em um volume final de 2,5 mL. Após a união das amostras foram retiradas alíquotas de 50µL das células termocompetentes em

tubos do tipo “Eppendorf” de 1 mL. Estes tubos foram inseridos imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C.

No dia seguinte foi testado a eficiência das células termocompetentes, com o vetor comercial pUC 19 (Thermo Fisher Scientific). Em um tubo eppendof contendo 50 µl de célula competente, foi inserido 50 ng do vetor. As células permaneceram no tubo envolto com gelo por aproximadamente 30 min, durante este período as células foram gentilmente agitadas para mistura homogênea entre o vetor e as células. Após este período o tubo foi transferido para um banho-maria a 42°C por 45 seg e retornadas imediatamente ao gelo, local a qual foram mantidas por mais 2 min. Estas células foram recuperadas com a adição de 950 µL SOC (40 µL de glicose 20% e 40 µL de cloreto de magnésio 1 M em meio SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,58 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, pH 7,5 para 1 L)) em 1, 5 horas a 37°C sob agitação constrante de 150 rpm no “Innova 4430 Incubation Shaker”.

Ao final deste processo, 200 µL das transformadas foram plaqueadas em meio LB adicionado de carbenicilina 50 ng/µL, IPTG 50 ng/µL e X-Gal 80 ng/µL. As colônias foram contadas após o seu crescimento, e o cálculo foi estimado levando-se em conta o número de colônias crescidas dividido pelo volume plaqueado.

4.5 Ensaios de expressão e solubilidade das proteínas

A fim de encontrar as condições adequadas para uma produção eficiente das proteínas recombinantes, vários parâmetros que afetam o crescimento da cultura e a expressão foram testados, incluindo temperatura (16, 20, 28 e 37°C), tempo de indução (4, 8 e 16 horas) e concentração de IPTG (0,1, 0,2 e 0,4 mM).

Após os ajustes dos parâmetros, as células de *E. coli* BL21 transformadas foram cultivadas em 5 mL de meio LB suplementado com o antibiótico canamicina (50 µg / mL), partindo-se de uma colônia previamente isolada. Esta amostra se manteve sob condições de agitação (250 rpm) a 37°C durante cerca de 16 h. Em seguida, 500 µL desta pré-cultura foi adicionado a 500 mL de meio de LB, contendo o antibiótico canamicina (50 µg / ml). A cultura foi incubada a 37°C com agitação de 250 rpm (*New Brunswick™ Incubator Shaker Series 25*) até atingir a $DO_{600nm} = 0,6$, quando então foi adicionado IPTG a uma concentração final de 0,2 mM para induzir a expressão das proteínas recombinantes. A incubação das culturas foi realizada sob diferentes

condições, como descrito abaixo. Para a expressão de HrpG e PhoR, as culturas foram mantidas sob agitação a 37°C durante 4 horas, enquanto que PhoB foi mantida a 28°C pelo mesmo período de tempo. Em todos os casos as células foram coletadas por centrifugação a 4°C e 1880 xg (HITACHI, *High - Speed Refrigerated Centrifuge CR22GIII*) durante 15 min, e ressuspensas em 100 mL de tampão PBS 1X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄), seguido de nova centrifugação, descarte do sobrenadante e congelamento e armazenamento do precipitado de células a -80°C. As células, foram descongeladas no gelo, ressuspensas em 100 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 5% Glicerol e 0,1% de NaN₃), sonicadas (pulsos de 10 seg e intervalos de 10 seg por 5 min), e centrifugadas a 30.000 xg por 15 min a 4°C, gerando as frações solúvel e insolúvel. Amostras destas frações foram visualizadas via eletroforese em gel de SDS-policrilamida (SDS-PAGE) para avaliar a quantidade e solubilidade das proteínas induzidas.

4.6 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação foi feita em cromatografia por afinidade de íons metálicos no cromatógrafo Akta Prime Plus FPLC System (GE, Amersham) usando a coluna de Ni²⁺-Sepharose® His-Trap Chelating de 5 mL (GE, Amersham). A fração solúvel descrita acima foi inserida na coluna previamente equilibrada com tampão de equilíbrio A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% glicerol, 30 mM imidazol). As proteínas retidas foram lavadas com cinco volumes de coluna com tampão A. A eluição das proteínas ligadas à coluna foi feita por um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% glicerol, 500 mM imidazol). Foram recolhidas frações a cada 2,0 mL com um fluxo de 2,0 mL/min. Todas as etapas foram analisadas em SDS-PAGE. No caso da proteína PhoR, em alguns testes foram adicionados aos tampões (tampão de lise, tampão A e tampão B) 8 M de uréia.

4.7 Diálise e quantificação de proteínas

O método de diálise utilizando a membrana Spectrapore (Membrane Tubing, Flat width 32 mm, diâmetro 20,4mm, MWCO 12 – 14.000 kd) foi realizado para retirada de imidazol das frações de proteínas que passaram pela coluna de Ni²⁺-Sepharose. As amostras de proteínas foram inseridas na membrana, previamente lavada com álcool

50% durante cerca de 30 min e depois enxaguadas abundantemente com água ultrapura gelada. As diálises, de um volume de aproximadamente 15 mL, foram feitas com 200 mL de tampão contendo 30mM Tris-HCl pH 7,5; 30 mM imidazol; 150 mM NaCl; 10% Glicerol, durante 2 horas, sob agitação, a 4°C. Posteriormente, este tampão foi trocado por 200 mL de tampão sem imidazol (30 mM Tris-HCl pH7,5; 150 mM NaCl; 10% Glicerol), permanecendo por mais 2 horas, com agitação, a 4°C.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford, de acordo com as recomendações do fabricante (Bradford Reagent Sigma-Aldrich).

5. RESULTADOS

5.1 Construção dos plasmídeos de expressão

Nossa estratégia de construção dos plasmídeos de expressão constituiu em clonar apenas as partes dos genes *hrpG*, *phoR* e *phoB* que codificam as supostas regiões de interação entre as proteínas. Os fragmentos selecionados para clonagem de cada um dos genes, quando induzidos, levariam à expressão de polipeptídeos cujas sequência de aminoácidos encontram-se destacados em cinza na Figura 9 abaixo.

HrpG -

MNDHSPPNAGSVFLLTQDARLVSVNASLAPLARNVSTFSDELELLRTRLRHSPCELLIFDASYVAADDSSLLAWQR
CHSGQPTPLIVLGRFDCADNILAWYRAGAQEV LALPFNSHELHVRAALAI SPVAHACPETQHLSVGPYRLIRDENT
VYLDGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPGVCFRRCQLAKAVWGSHTFTDRTMEQHIYKLRKKLQLSSDSSAVRIRTVY
SHGYKLELALHDTEATTMSKAVSPSLGPAHHAAC

PhoR -

MVTFSPMPQHIRSAWLKTLGTLALLGAAVVAGVLI GHVWMALTLTALGVLAWHYWRQLRRLRLTARQRAEPAAGI
GAWNELDRLLYRSQAEMRARKRRLIEMLRTRYRAAAQALPDAVVVDRNSQRVQWFNKAAGLLGLHHPGDMGVSIV
ERLQPLPLAHWLAAGRNAEPMLDAASPADPDLRLNLRLIPYSDDYWLLVARDVSKLLRLEQVRRDFVANVSHELRT
PLTVVHGYLDMLDPEDFPD SGPMLAEMRKQSQRMAQLVEDLLTSLRLESQEELGEEHVAMAPMLSTLRREAEHSQ
GRHTVEVIDEAGVDLLGSNKELHSAFNLVTNAVRYTPGGGTVTIRFVREGDGAALAVRDTGYGIPASHLPRI
TERFYRVSSSRRESGGTGLGLSIVKHILGLHQRALDIESEVGRGSEFSCHFVPARVVQREQSVPLSRSA

PhoB -

MQKRILIVDDEPAIRDMVAFALRKGEFEPIHAGDAREAQTAIADRVPDLILLDWMLPGTSGLDLARRWRKEQLTRE
IPIIMLTARGEENDRVGGLEAGVDDYVVKPFSARELLARIRAVMRRRTREDDGGSVAVGKLRIDGAAHRVFAGDAP
VPIGPTEYRLLHFFMTHPERVYTRTQLLDHVWGGSVYVEERTIDVHIRRLRKTLEPFGLNMQTVRSGSYRFSSA
T

Figura 9 - Representação das sequências de aminoácidos que constituem as proteínas Hrp, PhoR e PhoB de *Xac*. Áreas hachuradas na cor cinza indicam as regiões escolhidas para clonagem no vetor de expressão pET SUMO.

Para verificação da especificidade dos oligonucleotídeos, foram realizadas PCRs com DNA proveniente de cosmídeos e com DNA genômico de *Xac* para cada um dos

genes de interesse (Figura 10). As reações usando estes oligonucleotídeos geraram produtos específicos independente da fonte de DNA utilizada, exceto para *phoB*, cujo uso de DNA genômico não se mostrou satisfatório. Por este motivo, foi selecionado o DNA cosmidial para realização de todas as amplificações posteriores, cujos produtos foram utilizados nas clonagens.

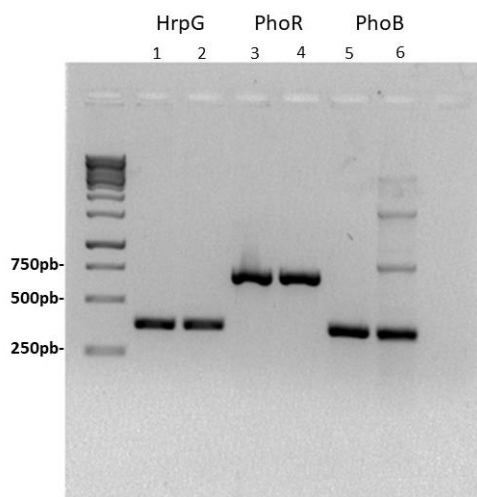


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10mg/mL) contendo produtos de amplificação das regiões codificadoras das sequências de aminoácidos mostradas na Figura 9. Coluna M corresponde ao marcador molecular 1 kb (DNA Ladder Promega); colunas 1, 3 e 5 correspondem aos produtos de amplificação dos genes *hrpG*, *phoR* e *phoB*, respectivamente, a partir de DNA cosmidial da biblioteca de *Xac* colunas 2, 4 e 6 correspondem aos produtos de amplificação dos genes *hrpG*, *phoR* e *phoB*, respectivamente, a partir de DNA genômico de *Xac*.

Os produtos de diversas reações de amplificação dos fragmentos dos genes *hrpG*, *phoR* e *phoB* contendo, 363, 693 e 360pb respectivamente, tiveram seus tamanhos confirmados em gel de agarose 1% (Figura 11). Posteriormente, os produtos de cada gene foram misturados em um mesmo tubo, purificados e usados como insertos para ligação no vetor de expressão pET SUMO, obtendo assim, três construções: His-SUMO-HrpG, His-SUMO-PhoR e His-SUMO-PhoB.

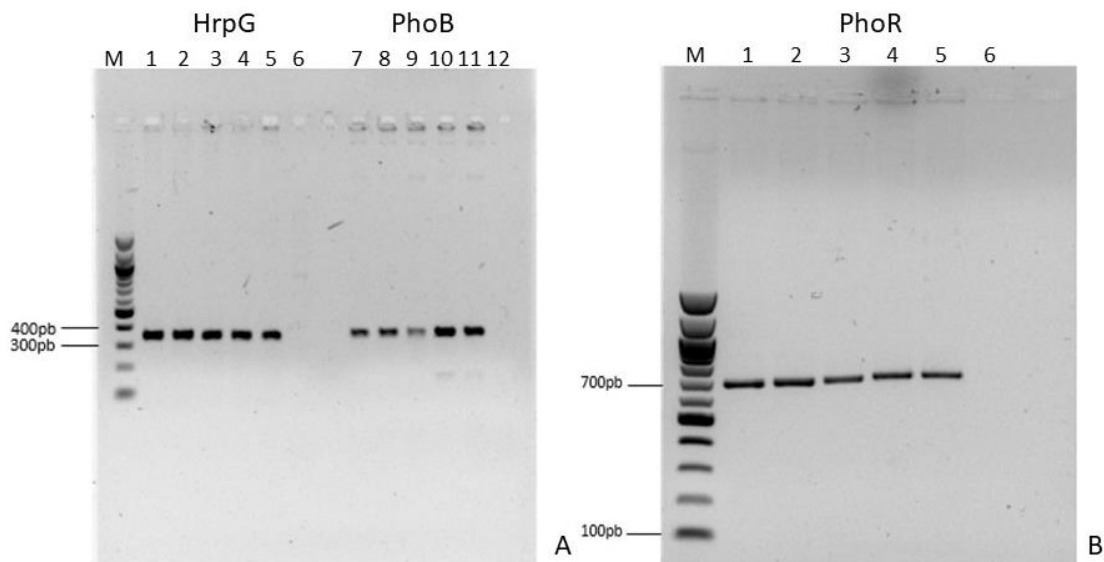


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) contendo os produtos de PCR. (A) Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular *O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ready-to-use*, colunas de 1 a 5 correspondem aos produtos de PCR do gene *hrpG* com 363 pb, colunas 7 a 11 correspondem aos produtos de PCR do gene *phoB* com 360 pb, colunas 6 e 12 correspondem aos controles negativos das reações. (B) Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular *O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ready-to-use*, colunas de 1 a 5 correspondem aos produtos de PCR do gene *phoR* com 693 pb, coluna 6 corresponde ao controle negativo da reação.

5.2 Verificação da construção correta nas clonagens dos genes *hrpG*, *phoB* e *phoR*

Os produtos das reações de ligação dos insertos nos vetores de expressão foram transformadas em *E. coli* DH10B, que foram selecionadas em meio com canamicina. PCR's de colônias foram então realizadas para constatação da inserção na posição correta no vetor (Figura 12). Uma representação esquemática de uma de nossas construções (His-SUMO-PhoR) pode ser observada na Figura 13.

O sequenciamento dos insertos proveniente de DNA plasmidial de duas colônias para cada gene confirmou que as construções estavam posicionadas corretamente, e sem ocorrência de mutações na sequência de nucleotídeos (Figura 14). Esta confirmação das construções nos permitiu prosseguir com as transformações dos vetores em células de *E. coli* BL21 para expressão das proteínas recombinantes.

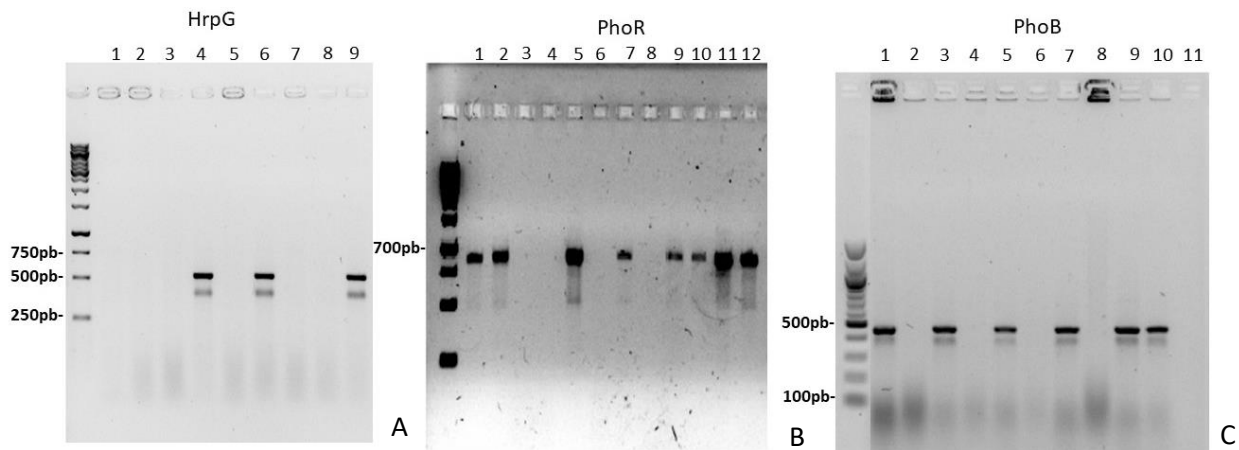


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) contendo produtos de PCR de colônia. A, B e C correspondem às amplificações usando como molde *E. coli* DH10B transformadas com os vetores recombinantes pET-SUMO-hrpG, pET-SUMO-phoR e pET-SUMO-phoB, respectivamente. As PCRs foram realizadas utilizando os primers *Forward* de cada gene de interesse (HrpG, PhoR e PhoB) e o primer *Reverse* do vetor.

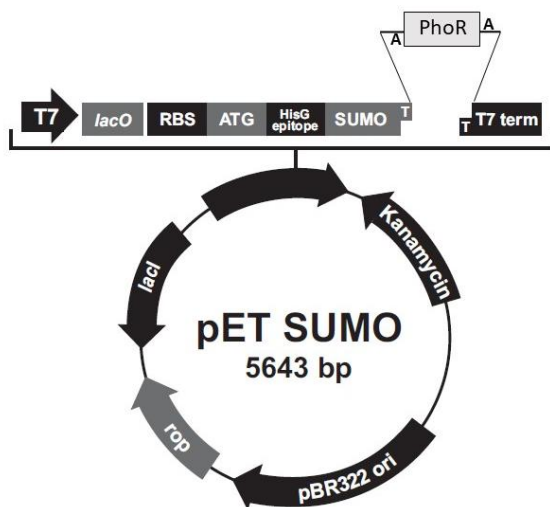


Figura 13 - Mapa do vetor recombinante pET-SUMO-PhoR, construído para este trabalho. Adaptado do manual de Champion™ pET SUMO Protein Expression System.

HrpG

GGGCAAAAAGCCTGAACAGACTTAGAGATGACCTGAAGATT**TGGACATGGAGGATAACGATATTATTG**
AGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGT**GCCGGATCGGTGTTCTCT**TTGACGCAGGATGCGCGCCTGGTC
TCGCAGGTCAACGCCAGCCTCGCACCGCTTGCAGCAATGTCTCGACGTTTTCCGATGAACTGGAGCT
TTTGCCTACGCTGCGGCATTCGCCGTGCGAGCTGCTGATCTTCGATGCCAGCTATGTGCCGCCGATG
ACAGTTCACTGCTGGCATGGCAGCGCTGCCATAGCGGCCAGCCACCCCGTTGATCGTGCTTGGACGT
TTCGATTGCGCAGACAACATTCTGGCCTGGTATCGCGCAGGCGCGCAGGAAGTCCTTGCCTGCCTTT
CAATTCGCACGAGTTACACGTGCGCGCGGCTGGCG**ATATCGCCGGTGGCGCAT****AGACAAGCTTAGG**
TATTTATTCGGCGCAAAGTGCCTCGGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGCACCACCACCACCACC
GAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGAAGNCTATTGCCCTT

PhoR

ACAGACTCAGCGACGACACTGAAGATT**TGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAA**
CAGATTGGTGGT**GATGTCAGCAAGCTGCTG**CGGCTGGAACAGGTGCGCCGCGATTTCTGGCCAACGT
CTCGCATGAACTGCGCACCCCGCTGACGGTGGTGCACGGTTATCTGGACATGCTCGACCCGGAAGATT
TCCCCGATTCGGGCCCGATGCTGGCGGAAATGCGCAAGCAATCCCAACGCATGGCGCAGCTGGTCGAA
GACCTGTTGACGCTCTCGCGGCTGGAATCGCAGGAAGAATCGGCGAAGAACACGTGGCGATGGCGCC
GATGCTGTGACCTTGCGCCGCGAGGCCGAGGCGCACAGCCAGGGCCGCATACCGTGGAGGTGATCG
ACGAGGCCGGCGTGGACCTGCTCGGCTCCAACAAGGAGCTGCACAGTGCCTTTTCCAATCTGGTGACC
AATGCGGTGCGCTACACGCCCGCGCGGCGCACGGTGCATCCGTTTTCTGCGCGAAGGCGATGGTGC
GGCGCTGGCAGTGCAGCACACCGGCTATGGCATTCCCGCCTCGCACCTGCCGCGCATCACCGAACGCT
TCTACCGCTCTCAGCAGCCGCTCGCGGAGAGCGGCGCACCGGGCTGGGGCTGTGATCGTCAAG
CACATCCTGGGGCTGCATCAGGCGCGCCTGGACATCGAAAGCGAAGTGGGGCGCGGCAGCGAAT**TCTC**
GTGTCATTTCTGACCG**AGACAAGCTTAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCCTCGGGTGA**AGCTGCCAA
CTTAGTCGAGCACCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGANNGTGATT
GCCC

PhoB

GCTAGCATGTGCGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGA
GACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTC
CTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTG
TACGACGGTATTAGAATTCAGCTGATCAGACCCCTGAAGAT**TGGACATGGAGGATAACGATATTAT**
TGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGT**AAACGCATTCTGATCGTC**GATGACGAACCCGCNNNNGAGT
CNCGTCGNACATGGTGGCGTTCGCGCTGCGCAAAGGCGAGTTCGAGCCCATCCATGCCGGCGATGCC
GCGAGGCGCAAACCGCCATCGCCGACCGCTGCCGACCTGATCCTGCTGGACTGGATGTTGCCAGGC
ACCAGCGGGCTGGACCTGGCAAGGCGCTGGCGCAAGGAGCAGCTGACCCGCGAGATTCCGATCATCAT
GCTACCCGCGCGCGGCGAAGAAAACGACCGCGTCCGGCGCCTGGAAGCCGGCGTCCGACGATTATGTGG
TCAAGCCGTTCTCGGCGCGCGANNNGCTNGCTGGCACGCATCCG**GCGGTGATGCGGCGCACC****AGAC**
AAGCTT

Figura 14: Resultado do sequenciamento dos vetores de expressão clonados em *E. coli* DH10B. As sequencias de nucleotídeos demonstram as construções His-SUMO-HrpG, His-SUMO-PhoR e His-SUMO-PhoB, respectivamente. Os nucleotídeos do vetor pET SUMO estão evidenciado na coloração azul; as sequencias dos oligonucleotídeos estão destacados em vermelho e as sequências dos genes parcialmente clonados de interesse estão demonstradas em cinza.

5.3 Indução e solubilidade das proteínas

A expressão das proteínas recombinantes foi testada variando-se o tempo de indução, temperatura e concentração do indutor IPTG a fim de escolher as melhores condições de expressão e solubilidade. A melhor condição para a expressão das proteínas recombinantes HrpG e PhoR foi a indução a 37°C, por 4 horas, utilizando 0,2 mM de IPTG e agitação de 250 rpm. Já para PhoB, a melhor temperatura de indução foi a 28°C, mantendo os demais parâmetros. Cabe aqui salientar que não foi possível obter a proteína recombinante PhoR na forma solúvel em nenhum destes testes (Figura 15). Resolvemos então realizar outros testes adicionando os detergentes Triton X-100 (1% e 2%), Chaps (1% e 2%) e Nonidet P-40 (1% e 2%) afim de auxiliar na solubilidade da proteína PhoR. Porém, ainda assim não foi possível obter a proteína PhoR em condições solúveis para a purificação e ensaios de interação física (Figura 16).

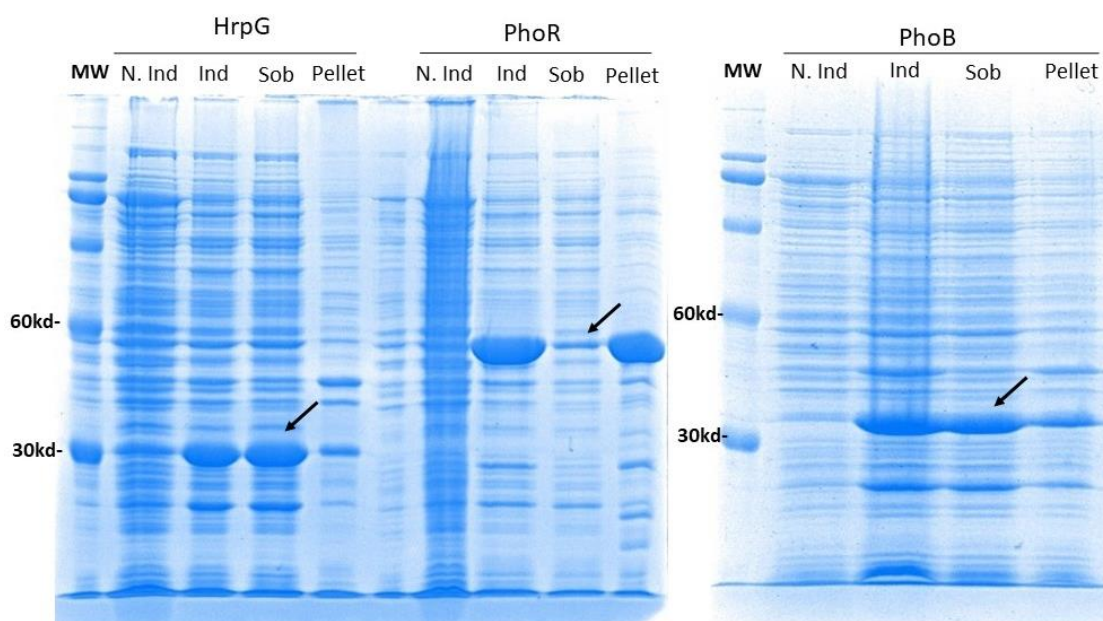


Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando experimentos de indução das proteínas HrpG, PhoR e PhoB. MW – marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker®*– Fermentas. N. Ind.- Frações celulares não induzidas. Ind. – Frações celulares após o processo de indução com IPTG. Sob - Fração sobrenadante. Pellet – Fração precipitada. As setas nas proteínas HrpG e PhoB indicam que, em ambas a maior porcentagem das proteínas de interesse permanece na fração solúvel. Já a seta em PhoR indica que a proteína não estava presente em sua maior proporção na fração solúvel.

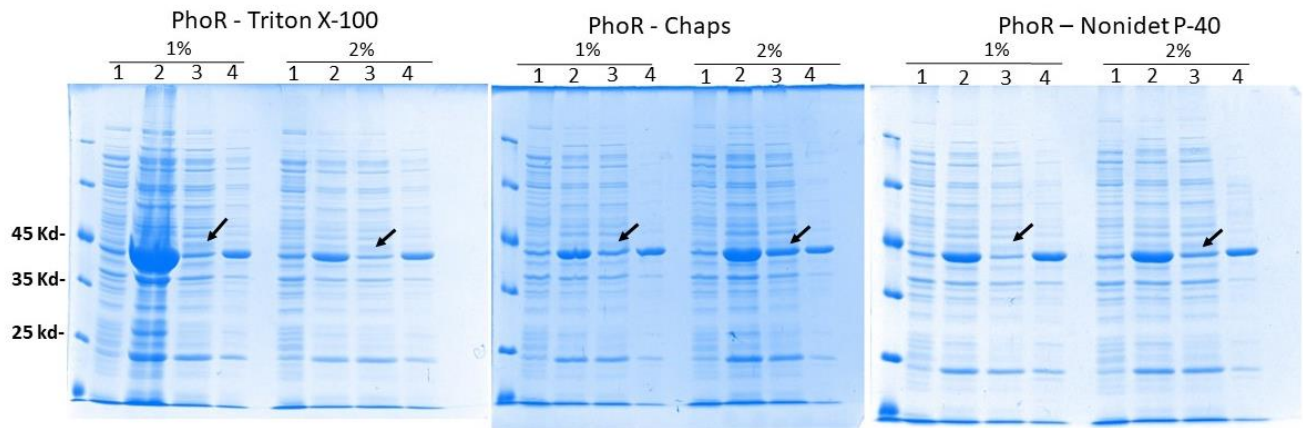


Figura 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando testes de solubilidade da proteína PhoR, sob as condições 28°C, 4 h, 0,2 mM IPTG, com os detergentes e concentrações indicados. 1, amostra não induzidas; 2, amostra induzidas das proteínas em *E. coli* BL21; 3, frações dos sobrenadantes ou frações solúveis e 4, proteínas encontradas nos precipitados. As setas indicam que não houve aumento significativo da solubilidade de PhoR, mesmo após a adição dos detergentes.

5.4 Purificação

A purificação das proteínas recombinantes HrpG e PhoB foi bem-sucedida, visto que foi obtido uma grande quantidade das proteínas com elevado grau de pureza. A Figura 17 mostra um exemplo de resultado de purificação via coluna de Ni²⁺-Sephrose, onde nota-se que a grande maioria das proteínas de BL21 foi eliminada nas fases *flow through* e *wash*, e uma grande quantidade da proteína recombinante foi eluída nas frações de 7 a 14. Este procedimento foi realizado três vezes para ambas as proteínas HrpG e PhoB. A quantidade final de proteína obtida por purificação foi cerca de 28 mg para HrpG e 6,6 mg para PhoB.

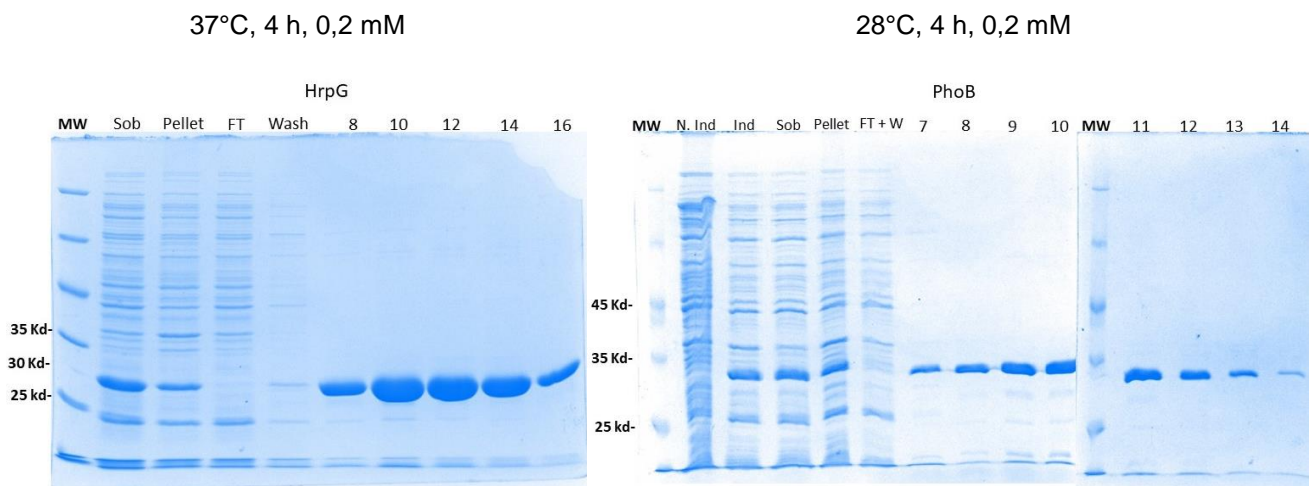


Figura 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando o resultado da purificação via coluna de Ni^{2+} -Sepharose das proteínas HrpG e PhoB. MW - Marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker®*-Fermentas. Sob- Fração solúvel. Pellet- Fração insolúvel. FT- *Flow throw*. *Wash* – fração das lavagens na coluna. Números 8 até 16 – tubos contendo as frações retiradas da coluna cromatográfica, correspondentes ao pico de eluição indicado pela absorbância a 280nm no aparelho ÄKTA prime plus (GE Healthcare Life Sciences).

Como não foram obtidas condições favoráveis para tornar a proteína PhoR solúvel para purificação, também tentamos a purificação da proteína na forma desnaturada, adicionando-se aos tampões de lise, A e B 8 M de ureia (Figura 18). A proteína recombinante, neste caso, se ligou à coluna de afinidade e foi eluída com características muito parecidas daquelas mostradas nas purificações de HrpG e PhoB. Em seguida o agente desnaturante foi retirado da fração proteica através do método de diálise, porém a proteína precipitou durante este procedimento, impossibilitando sua utilização.

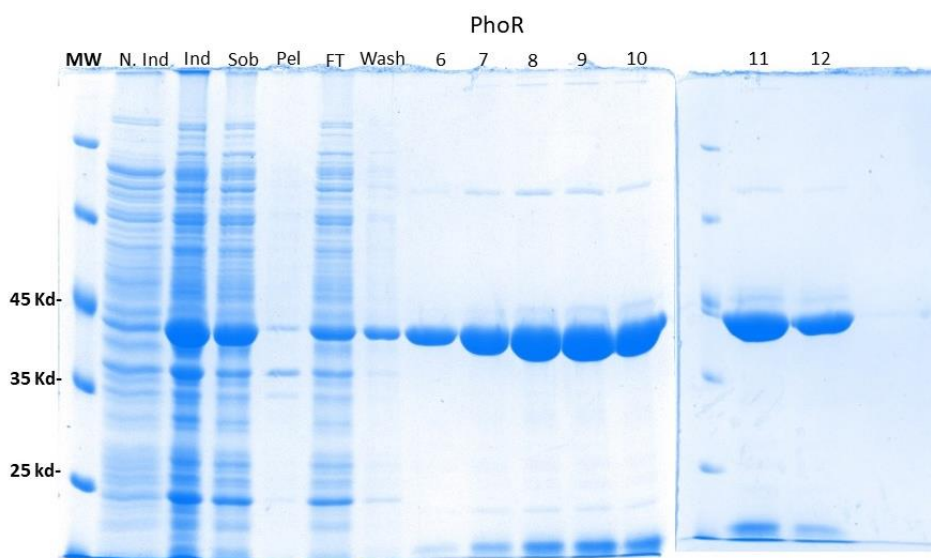


Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue ilustrando o resultado da purificação via coluna de Ni²⁺-Sepharose da proteína recombinante PhoR com tampão desnaturante contendo 8M de ureia. MW - Marcador molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker*®-Fermentas. N. Ind- Amostra não induzida; Ind. Amostra induzida; Sob- Fração solúvel. Pellet- Fração insolúvel. FT- Flow throw. Wash – Fração das lavagens na coluna. Números 6 até 12 – tubos contendo as frações retiradas da coluna cromatográfica de afinidade.

6. DISCUSSÃO

A *Xac* reconhece múltiplas condições de estresse nutricionais e físico-químicos no apoplasto celular, levando a alteração de diversas vias metabólicas para se adaptar (Mendoza, 2016). Neste contexto, estudos prévios de modelagem molecular e transcriptômica *in vivo* e *in vitro* (Mendoza 2016) sugerem uma possível relação entre a expressão dos genes do T3SS com o regulon *pho*, com regulação direta da atividade de HrpG por PhoR. Neste estudo, foi proposto que durante a infecção na planta, a *Xac* é capaz de perceber a baixa disponibilidade de Pi e induzir genes envolvidos no transporte deste composto e genes responsáveis pela colonização do hospedeiro. Portanto, o Pi poderia estar afetando a expressão dos genes do T3SS e este composto poderia ser um dos principais sinais ambientais captados pela *Xac* para dar início ao processo infeccioso através da expressão do T3SS. Esta proposição foi corroborada em testes em condições *in vitro* em que foram adicionadas altas concentrações de Pi no meio de cultura XVM2 e observado que a expressão do T3SS foi significativamente suprimida (Figura 5) (Mendoza, 2016).

Além deste, outros trabalhos tem demonstrado que o Pi pode estar relacionado com a expressão do T3SS, como no estudo observado com a bactéria *E. tarda* e *E. coli*, na qual mutações no gene *phoB* alteraram a expressão de genes de virulência relacionados com o T3SS (Chakraborty *et al.*, 2011; Chekabab *et al.*, 2014). Além disto, foi visto que mutações em genes que envolvem o transporte de Pi nas bactérias *X. axonopodis* pv. *glycines* e *Xac* exibiram perda de virulência. No entanto, os autores não citam qual seria o possível mecanismo associado a este fenótipo (Moreira *et al.*, 2015; Chatnaparat *et al.*, 2016).

Portanto, este estudo objetivou demonstrar que um dos reguladores principais do T3SS, o HrpG, pode ser ativado via fosforilação pelo receptor PhoR (do sistema de TCS) em *Xac*. Para isto, fez-se necessário a realização de técnicas de purificação por cromatografia de afinidade das proteínas destes sistemas, visando posteriormente o ensaio de interação física. Para verificar a interação física entre as proteínas HrpG e PhoR, foi proposto a técnica de *Pull down*, que consiste em utilizar a propriedade de uma das proteínas recombinantes de possuir uma cauda de His, combinada a uma técnica similar a purificação por afinidade. A proteína PhoR fusionada a His-SUMO seria então imobilizada na coluna de Ni-Sepharose®, para a qual a cauda His tem alta afinidade, e seria introduzido nesta coluna, individualmente, a proteína purificada PhoB (como controle da interação PhoR-PhoB já conhecida em outros sistemas) e HrpG (ambas proteínas sem His-SUMO, removidas por tratamento com SUMO protease) para verificação da interação física entre PhoR e PhoB, e entre PhoR e HrpG. Se houvesse interação entre PhoR e HrpG na coluna, os complexos proteicos seriam eluídos da coluna de Ni-Sepharose juntos.

Entretanto, ainda não foi possível alcançar a etapa de teste de interação física, devido ao fato de que a proteína PhoR ainda não foi obtida na forma solúvel e pura, e em sua configuração natural. Em um estudo realizado por Wang, Chen e colaboradores (2013), foi visto que, de fato, proteínas HK aparentam ser de difícil expressão e purificação em sua configuração nativa (Wang, Chen *et al.*, 2013). Muito provavelmente, estamos enfrentando dificuldades na purificação de PhoR devido a esta ser uma HK cuja localização é transmembranar e possuir regiões hidrofóbicas, diminuindo sua solubilidade e dificultando o processo de purificação. Outros grupos de pesquisa têm testado diferentes estratégias para expressar apenas determinados domínios de PhoR, de maneira a aumentar sua solubilidade. Com a finalidade de contornar esta limitação, neste trabalho foram clonados no vetor de expressão apenas

os domínios de PhoR que se encontram localizados na porção citoplasmática da proteína (domínio DhP/Ca). Um estudo demonstrou que mutações nestas regiões poderiam afetar a atividade desta HK (Wang, Chen *et al.*, 2013). Na tentativa de auxiliar o processo de solubilização de PhoR, foram utilizados detergentes, como Triton-x100, CHAPS, e Nonidet-P40, em diferentes concentrações, além da clonagem ter sido feita com o vetor pET-SUMO o qual possui uma proteína SUMO conjugada capaz de aumentar a solubilidade, porém em nenhuma das tentativas foi obtido sucesso.

Por não termos alcançado a purificação de PhoR em sua configuração nativa, outros testes encontram-se em curso. Novas construções de PhoR com os vetores de expressão pET MBP, pET28a e pBAD obtidos junto ao grupo de pesquisa da Profa. Dra. Andrea Balan Fernandes do Departamento de Microbiologia da USP (São Paulo) serão testados e analisados quanto a sua solubilidade. Além disso, outro protocolo de purificação encontra-se em fase de teste, utilizando tampão desnaturante com guanidina 6 M. Talvez novas construções e/ou protocolos diversificados de purificação possam solucionar nossas dificuldades.

Contudo, neste trabalho apresentamos as construções e condições ideais de indução e purificação das proteínas HrpG e PhoB, e os protocolos aqui gerados podem contribuir para a elucidação dos mecanismos de ativação do T3SS nas bactérias patogênicas que se utilizam deste sistema de virulência. A hipótese abordada neste trabalho abre uma série de relações entre o sistema TCS e o T3SS em *X. citri*, que até o momento ainda é pouco explorado e pode futuramente, contribuir para o desenvolvimento de novos alvos para o possível controle e erradicação não apenas do cancro, como também de outras doenças causadas por patógenos que utilizam o mesmo sistema de secreção como principal mecanismo de patogenicidade.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apontamos neste estudo que provavelmente o Pi seria um dos principais sinais que a *Xac* capta para induzir o sistema de patogenicidade, através da ativação do T3SS. Sugerimos que esta ativação pode ser realizada através da interação física direta entre duas proteínas de dois sistemas diferentes PhoR e HrpG.

Apesar de não termos purificado a proteína PhoR, apresentamos aqui as condições ideais de purificação das proteínas reguladoras de resposta HrpG e PhoB.

Consideramos também que apesar das interações físicas não terem sido possíveis, testes adicionais se encontram em andamento para que a proteína PhoR seja purificada, possibilitando os ensaios posteriores.

Este trabalho poderá ajudar na elucidação do mecanismo de ativação do T3SS, principal mecanismo de patogenicidade de *Xac*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, S. I. Bacterial flagella and type III secretion systems. **FEMS Microbiol Lett**, v. 202, n. 2, p. 157-64, Aug 21 2001. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520608> >.

ALBANESI, D. et al. Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 38, p. 16185-90, Sep 22 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805278> >.

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. 6186-97, Sep 2004. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342589> >.

ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, n. 1, p. 18-24, Feb 1999. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047552> >.

ANGOV, E.; LEGLER, P. M.; MEASE, R. M. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. **Methods Mol Biol**, v. 705, p. 1-13, 2011. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125377> >.

BERGER, C. et al. Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 7, p. 1963-74, Jul 2010. ISSN 1465-2080 (Electronic) 1350-0872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20378646> >.

BOCH, J.; BONAS, U. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. **Annu Rev Phytopathol**, v. 48, p. 419-36, 2010. ISSN 1545-2107 (Electronic) 0066-4286 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400638> >.

BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, v.292, p.2275-2278, 2001.

BUTTNER, D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria.

Microbiol Mol Biol Rev, v. 76, n. 2, p. 262-310, Jun 2012. ISSN 1098-5557 (Electronic) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688814> >.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 193-200, Apr 2006. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16529983> >.

Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiol Rev**, v. 34, n. 2, p. 107-33, Mar 2010. ISSN 1574-6976 (Electronic) 0168-6445 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925633> >.

BUTTNER, D.; HE, S. Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. **Plant Physiol**, v. 150, n. 4, p. 1656-64, Aug 2009. ISSN 0032-0889 (Print) 0032-0889 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458111> >.

BUTTNER, D. et al. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **J Bacteriol**, v. 184, n. 9, p. 2389-98, May 2002. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948151> >.

CHAKRABORTY, S. et al. Two-component PhoB-PhoR regulatory system and ferric uptake regulator sense phosphate and iron to control virulence genes in type III and VI secretion systems of *Edwardsiella tarda*. **J Biol Chem**, v. 286, n. 45, p. 39417-30, Nov 11 2011. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953460> >.

CHATNAPARAT, T.; PRATHUANGWONG, S.; LINDOW, S. E. Global Pattern of Gene Expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Within Soybean Leaves. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 29, n. 6, p. 508-22, Jun 2016. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282.

CHEKABAB, S. M.; HAREL, J.; DOZOIS, C. M. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. **Virulence**, v. 5, n. 8, p. 786-93, 2014. ISSN 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483775> >.

CHEN, Y. et al. Structure and function of the XpsE N-terminal domain, an essential component of the *Xanthomonas campestris* type II secretion system. **J Biol Chem**, v. 280, n. 51, p. 42356-63, Dec 23 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162504> >.

CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal Rio Grande Valley Horticulture Society**, v. 37, p. 127-146, 1984. Disponível em: <<http://www.rgvhortsociety.org-/SPSJ/v37%201984/v37%201984.pdf>>. Acesso em fevereiro de 2015.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 11, p. 811-25, Nov 2006. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041629> >.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 811, 11/01/online 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrmicro1526> >.

CREPIN, S. et al. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. **Vet Microbiol**, v. 153, n. 1-2, p. 82-8, Nov 21 2011. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700403> >.

DA SILVA, A. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-63, May 23 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12024217> >.

DENG, W. et al. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 6, p. 323-337, Jun 2017. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28392566> >.

DOMINGUES, M. N. et al. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. **Mol Plant Pathol**, v. 11, n. 5, p. 663-75, Sep 2010. ISSN 1364-3703 (Electronic) 1364-3703 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696004> >.

FACINCANI, A. P. et al. Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Funct Integr Genomics**, v. 14, n. 1, p. 205-17, Mar 2014. ISSN 1438-7948 (Electronic) 1438-793X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676796> >.

FELDMAN, M. F.; CORNELIS, G. R. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. **FEMS Microbiol Lett**, v. 219, n. 2, p. 151-8, Feb 28 2003. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620614> >.

FUJIKAWA, T. et al. Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 19, n. 3, p. 342-9, Mar 2006. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16570663> >.

FURUTANI, A. et al. Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 22, n. 1, p. 96-106, Jan 2009. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061406> >.

GALAN, J. E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1322-8, May 21 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334981> >.

GALÁN, J. E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v. 444, p. 567, 11/30/online 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nature05272> >.

GAUDRIault, S. et al. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. **Mol Microbiol**, v. 26, n. 5, p. 1057-69, Dec 1997. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426142> >.

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, Jan 1 2004. ISSN 1364-3703 (Electronic) 1364-3703 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565577> >.

GREBE, T. W.; STOCK, J. B. The histidine protein kinase superfamily. **Adv Microb Physiol**, v. 41, p. 139-227, 1999. ISSN 0065-2911 (Print) 0065-2911 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500846> >.

GUO, Y. et al. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 24, n. 6, p. 649-61, Jun 2011. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261465> >.

GURLEBECK, D.; THIEME, F.; BONAS, U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. **J Plant Physiol**, v. 163, n. 3, p. 233-55, Feb 2006. ISSN 0176-1617 (Print) 0176-1617 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386329> >.

HARTMANN, N.; BUTTNER, D. The inner membrane protein HrcV from *Xanthomonas* spp. is involved in substrate docking during type III secretion. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 26, n. 10, p. 1176-89, Oct 2013. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777429> >.

HARTMANN, N. et al. Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 5, p. 1334-49, May 2012. ISSN 1465-2080 (Electronic) 1350-0872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343358> >.

HAUSNER, J. et al. The periplasmic HrpB1 protein from *Xanthomonas* spp. binds to peptidoglycan and to components of the type III secretion system. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 20, p. 6312-24, Oct 2013. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934485> >.

HSIEH, Y. J.; WANNER, B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 2, p. 198-203, Apr 2010. ISSN 1879-0364 (Electronic) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171928> >.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 2, p. 379-433, Jun 1998. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618447> >.

HUGUET, E. et al. hpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. **Mol Microbiol**, v. 29, n. 6, p. 1379-90, Sep 1998. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781876> >.

HUNT, I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. **Protein Expr Purif**, v. 40, n. 1, p. 1-22, Mar 2005. ISSN 1046-5928 (Print) 1046-5928 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721767> >.

JACIANI, F. J. et al. Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* infecting swingle citrumelo in Brazil. **Plant Disease**, v. 93, n. 10, p. 1074-1074, 2009.

JACOB, T. R. et al. Type IV Secretion System Is Not Involved in Infection Process in Citrus. **Int J Microbiol**, v. 2014, p. 763575, 2014. ISSN 1687-918X (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24707292> >.

JACOBSEN, S. M. et al. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 180-93, Mar 2008. ISSN 0928-8244 (Print) 0928-8244 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18194341> >.

JALAN, N.; YAN, Q.; KGENARU, K.; JONESM J.B.; GRAHAM, J.H.; WANG, N. Genomics of *Xanthomonas citri* and Related Species. In: GROSS, D.C.; LICHENS-PARK, A.; LOLE, C. **Genomics od Plant-Associated Bacteria**. (Ed.) Springer, p. 151-176, 2014.

JENNINGS, M. E. et al. Characterization of *Salmonella* type III secretion hyper-activity which results in biofilm-like cell aggregation. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33080, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22412985> >.

JUDE, F. et al. Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, v. 185, n. 12, p. 3558-66, Jun 2003. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775693> >.

KAY, S.; BONAS, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 37-43, Feb 2009. ISSN 1879-0364 (Electronic) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168386> >.

KOEBNIK, R. et al. Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. **J**

- Bacteriol**, v. 188, n. 21, p. 7652-60, Nov 2006. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936021> >.
- KOLLER, O. L.; SOPRANO, E.; BOANS, U. Normas técnicas para a cultura de citros em Santa Catarina. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina. **S.A - EPAGRI**, v 14. n 1. 66 p,1994.
- 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. 9, p. 12, Jan 16 2009. ISSN 1471-2180 (Electronic) 1471-2180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149882> >.
- LAMARCHE, M. G. et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, n. 3, p. 461-73, May 2008. ISSN 0168-6445 (Print) 0168-6445 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248418> >.
- LINDGREN, P. B.; PEET, R. C.; PANOPOULOS, N. J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. **J Bacteriol**, v. 168, n. 2, p. 512-22, Nov 1986. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3023280> >.
- LORENZ, C. et al. HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 6, p. e1000094, Jun 27 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584024> >.
- MARINA, A.; WALDBURGER, C. D.; HENDRICKSON, W. A. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. **EMBO J**, v. 24, n. 24, p. 4247-59, Dec 21 2005. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319927> >.
- MCCANN, H. C.; GUTTMAN, D. S. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. **New Phytol**, v. 177, n. 1, p. 33-47, 2008. ISSN 0028-646X (Print) 0028-646X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078471> >.
- METZ, M. et al. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. **Plant J**, v. 41, n. 6, p. 801-14, Mar 2005. ISSN 0960-7412 (Print) 0960-7412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743446> >.
- MENDOZA, ELKIN FERNANDO RODAS. Identificação de genes-alvos na patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com enfoque no sistema de secreção tipo III [dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2016.
- MITROPHANOV, A. Y.; GROISMAN, E. A. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. **Genes Dev**, v. 22, n. 19, p. 2601-11, Oct 1 2008. ISSN

0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832064> >.

MOGLICH, A.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. **Structure**, v. 17, n. 10, p. 1282-94, Oct 14 2009. ISSN 1878-4186 (Electronic) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836329> >.

MOREIRA, L. M. et al. Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. **Funct Integr Genomics**, v. 15, n. 2, p. 197-210, Mar 2015. ISSN 1438-793x.

MUELLER, C. A. et al. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 674-6, Oct 28 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254184> >.

MUR, L. A. et al. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **J Exp Bot**, v. 59, n. 3, p. 501-20, 2008. ISSN 1460-2431 (Electronic) 0022-0957 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079135> >.

NOEL, L. et al. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Mol Microbiol**, v. 41, n. 6, p. 1271-81, Sep 2001. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11580833> >.

OH, Y. et al. Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Genome Biol**, v. 9, n. 5, p. R85, 2008. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492280> >.

PARKINSON, J. S. Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 101-22, 2010. ISSN 1545-3251 (Electronic) 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20690824> >.

PARSOT, C.; HAMIAUX, C.; PAGE, A. L. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 7-14, Feb 2003. ISSN 1369-5274 (Print) 1369-5274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615213> >.

PAGE, A. L.; PARSOT, C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Molecular microbiology*, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2002.

PAUL, B. J. et al. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 311-22, Aug 6 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294157> >.

PODGORNAIA, ANNA I. et al. Structural Basis of a Rationally Rewired Protein-Protein Interface Critical to Bacterial Signaling. **Structure**, v. 21, n. 9, p. 1636-1647, 2013/09/03/ 2013. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212613002542> >.

PONTING, C. P.; ARAVIND, L. PAS: a multifunctional domain family comes to light. **Curr Biol**, v. 7, n. 11, p. R674-7, Nov 1 1997. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382818> >.

POZIDIS, C. et al. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. **J Biol Chem**, v. 278, n. 28, p. 25816-24, Jul 11 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734178> >.

QIAN, W. et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Res**, v. 15, n. 6, p. 757-67, Jun 2005. ISSN 1088-9051 (Print) 1088-9051 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899963> >.

RAO, P. S. et al. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 573-86, Jul 2004. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15228535> >.

ROSSIER, O.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 828-38, Nov 2000. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115117> >.

ROSSIER, O. et al. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 16, p. 9368-73, Aug 3 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430949> >.

SAMUELSON, J. C. Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. **Methods Mol Biol**, v. 705, p. 195-209, 2011. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125387> >.

SCHULTE, R.; BONAS, U. A *Xanthomonas* Pathogenicity Locus Is Induced by Sucrose and Sulfur-Containing Amino Acids. **Plant Cell**, v. 4, n. 1, p. 79-86, Jan 1992. ISSN 1532-298X (Electronic) 1040-4651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297631> >.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, v. 115, n. 2, p. 113-28, Jan 26 2005. ISSN 0168-1656 (Print) 0168-1656 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607230> >.

SORY, M. P.; CORNELIS, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. **Mol Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 583-94, Nov 1994. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7885236> >.

STEPHENSON, K.; HOCH, J. A. Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets. **Curr Opin Pharmacol**, v. 2, n. 5, p. 507-12, Oct 2002. ISSN 1471-4892 (Print) 1471-4892 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324251> >.

TANG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J. M. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 19, n. 11, p. 1159-66, Nov 2006. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17073299> >.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 4, p. 420-30, Aug 2000. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873830> >.

TSUGE, S. et al. Gene involved in transcriptional activation of the hrp regulatory gene hrpG in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 11, p. 4158-62, Jun 2006. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707710> >.

VAN DIJK, K. et al. The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of *Pseudomonas syringae*. **Mol Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 1469-81, Jun 2002. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067337> >.

WANG, C. et al. Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. **PLoS Biol**, v. 11, n. 2, p. e1001493, 2013. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468592> >.

WANG, C. et al. Mechanistic Insights Revealed by the Crystal Structure of a Histidine Kinase with Signal Transducer and Sensor Domains. **PLOS Biology**, v. 11, n. 2, p. e1001493, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001493> >.

WANG, L. et al. Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 24, p. 8023-7, Dec 2007. ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981946> >.

WATTIAU, P. et al. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 22, p. 10493-7, Oct 25 1994. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937981> >.

WEBER, E.; KOEBNIK, R. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **J Bacteriol**, v. 187, n. 17, p. 6175-86, Sep 2005. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16109959> >.

WENGELNIK, K. et al. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **J Bacteriol**, v. 178, n. 4, p. 1061-9, Feb 1996. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576039> >.

WENGELNIK, K.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 9, n. 8, p. 704-12, Nov 1996. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8870269> >.

WEST, A. H.; STOCK, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **Trends Biochem Sci**, v. 26, n. 6, p. 369-76, Jun 2001. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406410> >.

WEN-XIANG, Z.; YANG-CHUN, H.; YI-PING, C.; MEI-QIN, Z.; YU-RONG, L.; LI-FANG, Z.; GONG-YOU, C. HrcJ is involved in Type-III Apparatus Formation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* for Hypersensitive Response in Nonhost Tobacco and Pathogenicity in Rice. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 1, p. 1-2, 2010.

WINANS, S. C. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media. **J Bacteriol**, v. 172, n. 5, p. 2433-8, May 1990. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185220> >.

YAN, Q.; WANG, N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 25, n. 1, p. 69-84, Jan 2012. ISSN 0894-0282 (Print) 0894-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899385> >.

YIP, C. K.; STRYNADKA, N. C. New structural insights into the bacterial type III secretion system. **Trends Biochem Sci**, v. 31, n. 4, p. 223-30, Apr 2006. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537106> >.

YOSHIMUCHI, T. et al. Expression of hrpG and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, n. 3, p. 196-204, June 01 2009. ISSN 1610-739X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0157-1> >.