
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA**

**SELEÇÃO DE SÍTIO DE DIVISÃO EM XANTHOMONAS CITRI SUBSP.
CITRI: CARACTERIZAÇÃO DE MINC.**

GIORDANNI CABRAL DANTAS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Novembro - 2015

574.88 Dantas, Giordanni Cabral
D192s Seleção de sítio de divisão em *Xanthomonas citri* subsp.
citri : caracterização de minC / Giordanni Cabral Dantas. -
Rio Claro, 2016
99 f. : il., figs., gráfs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Henrique Ferreira

1. Biologia molecular. 2. Expressão gênica. 3. Septo. 4.
Divisão celular. 5. GFP. 6. minC. I. Título.

GIORDANNI CABRAL DANTAS

**SELEÇÃO DE SÍTIO DE DIVISÃO EM *XANTHOMONAS CITRI*
SUBSP. *CITRI*: CARACTERIZAÇÃO DE MINC.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas

Rio Claro – SP

2016

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: SELEÇÃO DE SÍTIO DE DIVISÃO EM XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI:
CARACTERIZAÇÃO DE MINC..

AUTOR: GIORDANNI CABRAL DANTAS

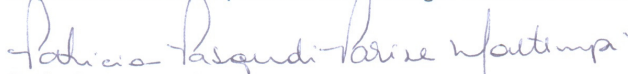
ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

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



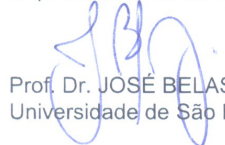
Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR

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



Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR

Universidade de São Paulo, Câmpus Luiz de Queiroz



Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

Instituto Agrônômico de Campinas

Rio Claro, 03 de fevereiro de 2016

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer aos meu pais Taunaí e Wanda, pois sem eles não estaria aqui realizando esse trabalho. Agradecê-los por me compreenderem em não poder participar das ultimas festas natalinas e por não estar presente em seus aniversários e num dos momentos mais difíceis da minha vida, quando descobrimos que meu pai estava com câncer.

Quero agradecer imensamente ao meu orientador Henrique, pelo grande aprendizado que foi esses últimos 3 anos que passamos juntos, pela IMENSA paciência que teve comigo e por ter me aceitado como orientando que caiu de para-quedas no laboratório dele, que mais uma vez estava de mudança. Mas o que eu mais agradeço-lhe foram por todos os puxões de orelhas que levei (alguns extremamente bem colocados).

Aos meus colegas de laboratório Daniel e Fernanda (ICs que nunca vou esquecer), Abigail (Biga linda do meu S2), Lúcia pelo auxílio com as queridas plantinhas da estufa e a Luana por fazerem parte do meu dia a dia, pela conversas e pelos cafés na copa em momentos vagos. E um grande agradecimento mais que especial a Lilian, que juntos começamos praticamente do 0 pois tivemos que montar o laboratório junto com o Henrique, por ter me aturado e me dado conselhos maravilhosos que levarei para o resto da minha vida.

Ao Vlamir, um grande amigo que me deu a mão. Você, meu amigo, me ajudou quando eu não conhecia ninguém aqui em RC e que sempre vai morar aqui no S2.

Agradecer ao Paulo Ávila por todas as conversas científicas, pelas discussões de metodologias, pelas viagens a Piracicaba para irmos ao shopping só pra bater perna e conversar besteiras. Você, Paulo, é mais um que mora aqui no S2.

Adriano, obrigado pelos socorros que me deu sobre química, pelos cafés já prontos, pelas conversas e pelo natal que passei com sua família.

Agradeçobastante aos colegas de departamento Rafinha, Paola, Mariana, Viviane, Mirella, Juliane, Edmara, Vinicius, Luciana, Susan, Dayane, Marina Vitti e Marina Turini por terem me proporcionado momentos felizes e ótimas conversas nessa minha estadia.

Quero agradecer imensamente ao Igor e Lorena por fazerem parte da minha vida, por me alegrarem, por me chamar pra tomar café ou simplesmente para ir bater perna só por que estão entediados.

Quero agradecer ao Gustavo Keine por ter entrado na minha vida bagunçar tudo e ao mesmo tempo deixar tudo organizado, por me ensinar a gostar de gatos pois sem você eu não teria o ser mais precioso da minha vida, a Mirri. E agradecer por estar comigo nesses 3 anos de relacionamento que temos estado juntos.

E por fim agradecer a UNESP-RC pela estrutura de apoio que me serviu para realização desse trabalho e sonho, a CAPES e a FAPESP (processo: 2013/19806-5) pelo auxílio financeiro que me foi dado.

O meu muito obrigado a todos.

Sumário

	Página
Capítulo 1	
1. Introdução	8
1.1 A citricultura e o cancro cítrico	8
1.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	11
1.3 Divisão celular bacteriana	12
1.4 Sistema MinCDE	16
1.5 Oscilação do sistema Min	18
Capítulo 2	
2. Hipótese a ser testada	21
3. Objetivos	21
3.1 Objetivos específicos	21
4. Significância e relevância da proposta	21
5. Material e métodos	22
5.1 Linhagens bacterianas e cultivo	22
5.2 Meio mínimo XAM1 para Xac	22
5.2.1 Preparo das soluções a serem utilizadas	22
5.2.2 Composição do XAM1 pH=5,4	23
5.3 Biologia Molecular	23
5.4 Vetores de expressão	23
5.5 Knockout gênico	27
5.6 Amplificação para clonagem e diagnóstico	31
5.7 SDS-PAGE e Western Blotting	32
5.8 Microscopia	32
5.9 Teste de patogenicidade	33
Capítulo 3	
A Protein Expression System for Tandem AffinityPurification in <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	
Capítulo 4	
6. Resultados e discussão	37
6.1 Atividade de minCDE em Xac	37
6.2 Deleção de <i>minC</i> em Xac promove erros de divisão celular	40
6.3 Mutantes de Xac retém habilidade de colonizar hospedeiro citros	46
6.4 O gene <i>minC</i> é requerido para uma septação normal em Xac	48
6.5 XacΔminC pode ser complementado com GFP-MinC	51
6.6 GFP-MinC apresenta localização dinâmica em Xac	54
7. Conclusão	58
8. Referências	59

RESUMO

A citricultura é uma das atividades mais importantes do setor agrícola brasileiro. A incidência de doenças como o cancro cítrico afeta sobremaneira a produtividade dos pomares. Seu agente etiológico, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é capaz de infectar todas as espécies cultivadas, não havendo cura para plantas afetadas. O controle eficaz para o cancro cítrico constitui a eliminação de plantas infectadas em programas rigorosos para conter a propagação da bactéria. No entanto, o relaxamento recente nas políticas de combate ao cancro cítrico em áreas como o estado de São Paulo – Brasil está contribuindo para uma maior incidência da doença. Neste aspecto, o conhecimento da biologia deste patógeno de plantas é de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença. No presente trabalho, estudamos a função da ORF XAC1226, que apresenta homologia com o gene *minC* de *E. coli*. Nesta última, *minC* codifica para uma proteína inibidora da polimerização de FtsZ e com função de seleção de sítio de montagem do anel de divisão celular. MinC^{Xac} demonstrou ter uma função semelhante que seus homólogos em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Para fazer a caracterização funcional de *minC* de Xac fizemos sua deleção, que resultou nos fenótipos de filamentação e minicélula, que são encontrados em *E. coli* e *B. subtilis*. Notamos que o mutante XacΔ*minC* apresenta ramificações que podem estar relacionadas a um posicionamento errôneo do septo. Posteriormente investigamos o padrão de localização sub-celular de GFP-MinC em Xac e percebemos um padrão de acúmulo da proteína num dos polos e um tempo depois esse acúmulo oscilava para o polo oposto demonstrando o mesmo padrão de oscilação como é observado em *E. coli*. Em seguida verificamos se XacΔ*minC* perdia a capacidade de infectar os hospedeiros e inoculamos em folhas de laranja e pera. Constatamos que XacΔ*minC* era capaz de induzir o cancro nas folhas. Concluímos que Xac utiliza o

sistema minCDE como controlador de posicionamento de septo, que a deleção não altera a virulência e que MinC apresenta o mesmo padrão de oscilação como em *E.coli*.

Palavras chave: GFP-MinC, divisão celular, septo, FtsZ, *minC*.

ABSTRACT

Citriculture is one of the most important activities of Brazilian agricultural sector. The incidence of diseases such as citrus canker affects drastically the orchards productivity. Its etiologic agent, the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) is able to infect all citric cultivars, without any treatment to the diseased plants. Effective control for citrus canker is the elimination of infected plants in rigorous programs to contain the spread of the bacteria. However, the recent relaxation in the policies against the fight of citrus canker in areas such as the state of São Paulo - Brazil is contributing to the further spread of the disease. The knowledge of the biology of this pathogen and also the mechanisms involved in plant-pathogen interactions are great worth in supporting the development of new strategies to deal with this disease. In this aspect, the knowledge of the biology of the plant pathogen is of great importance for the development of new strategies of control of the disease. In this paper, we study the function of ORF XAC1226, which has homology to the *minC* gene of *E. coli*. *minC* encodes an inhibitor protein of FtsZ polymerization and the cell division ring mounting site selection function. MinC^{xac} shown to have a similar function as their counterparts in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. To make the functional characterization of Xac's MinC we made a deletion which resulted in phenotypes of minicell and filamentation, which are found in *E. coli* and *B. subtilis* and we noticed that the mutant XacΔ*minC* has branches that may be related to a wrong position of the septum. Subsequently we investigated the pattern of sub-cellular GFP-MinC in Xac and noticed a protein accumulation pattern in one of the poles and a while after this protein oscillated to the opposite pole showing the same pattern of oscillation as observed in *E. coli*. Then we check if XacΔ*minC* lost the ability to infect the host and we inoculated it in sweet orange leaves. We found that XacΔ*minC* was able to induce cancer in leaves. We conclude that Xac uses minCDE

system as septum positioning controller, which deletion does not alter virulence and MinC has the same oscillation pattern as *E. coli*.

Keywords: GFP-MinC, cell division, FtsZ, septum, *minC*.

CAPÍTULO 1

1.INTRODUÇÃO

1.1 A citricultura e o cancro cítrico

O Brasil é atualmente um dos maiores produtores mundiais de cítricos detendo a liderança mundial na produção e exportação de suco de laranja (Neves, 2011). A atividade citrícola brasileira gera mais de 230 mil postos de trabalho, correspondendo a uma massa salarial de R\$ 676 milhões anuais. Pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de plantas na última década, sendo a sanidade um dos maiores desafios desse setor econômico. Dentre as principais doenças da cultura está o cancro cítrico, para a qual não há métodos de controle curativo ou que resultem em controle efetivo com baixo custo financeiro.

Vale ressaltar que, o processamento da laranja gera outros subprodutos de valor agregado como óleos, pectina, farelo e álcool. A pectina, por exemplo, é um polissacarídeo de monômeros de ácido galacturônico que possui propriedades geleificante e espessante muito apreciadas nas indústrias alimentícia e farmacêutica (Sriamornsak, 2003). Da casca da laranja também se extrai um óleo essencial, do qual é separado o D-Limoneno, um monoterpene monocíclico (hidrocarboneto) com propriedades aromatizante e flavorizante de uma ampla gama de aplicações, como formulações cosméticas, alimentícias, farmacêuticas, solventes orgânicos biodegradáveis e síntese química do mentol e carvona (Demyttenaere & Kimpe, 2001).

O cancro cítrico é uma doença causada pelas bactérias *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xac) (Schaad et al., 2005; Schaad et al., 2006). Dentre estas, Xac é responsável pelo cancro cítrico asiático ou cancrose do tipo A, que constitui a forma mais severa da doença e que acomete todas as variedades e espécies de citros, representando um dos mais graves problemas para esta cultura ao redor do mundo. Introduzida no Brasil em

1957 na região de Presidente Prudente (Bitancourt,1957), esta bactéria é altamente contagiosa, podendo resistir no ambiente como epífita, sendo dispersa naturalmente pelo vento ou chuva e podendo penetrar na planta por qualquer tipo de abertura natural (estômatos) ou ferimentos (Gottwald et al., 2002).

Os sintomas do cancro cítrico constituem-se por lesões circulares, corticosas e salientes, de coloração marrom e aspecto eruptivo, ocorrendo em folhas, ramos e frutos. Nas folhas e frutos é comum o aparecimento de um halo amarelo circundando a área necrosada. Em estágios mais avançados, pode ocorrer perda de folhas, queda de frutos e ressecamento dos ramos (Stall & Seymour, 1983; Das, 2003). Os sintomas do cancro são lesões nas folhas, frutos e ramos (Figura 1). Nas folhas e frutos ocorrem pequenas manchas amarelas e circulares que, com o passar do tempo, aumentam de tamanho adquirindo uma coloração parda circundada por um halo amarelado (Gottwald et al., 2002). Esses sintomas são possivelmente decorrentes da degradação da clorofila e pectina (Gottwald et al., 2002). Nos ramos as lesões são em forma de grandes crostas de cor parda (Figura 1c). Com o progresso da doença, as lesões podem acelerar a queda de folhas e frutos por conta do aumento da produção de etileno em resposta ao estresse biótico (Gottwald et al., 2002).

Figura 1. Lesões de cancro cítrico causadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.



A) folhas, B) fruto e destaque para a lesão corticosa, C) ramo. Fonte: FUNDECITRUS, 2015a.

A propagação da bactéria se dá através do filme de água que serve como caminho entre uma planta e outra. Chuva, em conjunto com ventos, também ajuda na penetração da bactéria através dos estômatos de tecidos jovens, sendo considerado o principal agente de dispersão a média distância (Galli, 1980; Gottwald et al., 2002). Gotículas de água são transportadas pelo vento por uma distância de aproximadamente 6 metros, carregando a bactéria aderida através de uma mucilagem (goma xantana) produzida por ela, motivo pelo qual a doença é mais comum em regiões tropicais do que em regiões de clima seco (Milind, 2003).

Um dos fatores que pode favorecer a disseminação do cancro cítrico a partir de plantas doentes é a larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera:Gracillariida), cuja constatação se deu em março de 1996 na região de Limeira (SP) e que rapidamente se espalhou pelo país (Chagas et al., 2001).

A erradicação de plantas sintomáticas e das suspeitas de infecção ainda é a principal forma de controle no estado de São Paulo (Belasque Jr. et al., 2009). Em junho de 2009, houve alteração da legislação para controle da doença neste estado, tendo sido revogada a obrigatoriedade de se erradicar a totalidade de plantas de um talhão apresentando índice de contaminação por Xac superior a 0,5%. Como consequência disto, já foi verificada um aumento na incidência de cancro cítrico em 2010, resultante dos menores esforços empregados na supressão da doença (Belasque Jr., et al., 2010). Mais recentemente (Resolução SAA - 147, de 31-10-2013), houve nova alteração de legislação na qual não é mais obrigatório fazer a erradicação das plantas que estiverem em um raio de 30 metros de uma planta contaminada com cancro cítrico. Passa a adotar-se a eliminação da planta contaminada e pulverização com cobre das plantas no raio de 30 metros. Assim, estratégias de controle mais eficazes e menos custosas tornaram-se ainda mais necessárias para a manutenção da competitividade da citricultura brasileira.

No estado do Paraná, uma alternativa as medidas de erradicação tem sido o manejo integrado para prevenir ou diminuir o cancro cítrico (Behlau et al., 2007, 2008, 2010). O Manejo Integrado envolve três aspectos: 1) determinar como o ciclo vital de um patógeno precisa ser modificado, de modo a mantê-lo em níveis baixos; 2) combinar o conhecimento biológico com a tecnologia disponível para alcançar a modificação necessária; 3) desenvolver métodos de controle adaptados às tecnologias disponíveis e compatíveis com aspectos econômicos e ecológico-ambientais (Geier, 1966).

1.2 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Anteriormente classificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Vauterin et al., 1995) e reclassificada como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006), este patógeno de citros é uma Proteobactéria Gram-negativa, bacilóide, aeróbia e possui flagelo unipolar (Gali, 1980). A classificação atual está baseada em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP e re-associação DNA-DNA (Schaad et al., 2005).

As colônias isoladas em placa apresentam coloração amarelo-alaranjado, característica do gênero (do Amaral, 2003). Xac, como ainda é citada na literatura, é o agente causal do cancro cítrico asiático ou cancrose do tipo A, que representa a forma mais generalizada e grave da doença (Gottwald et al., 2002).

O sequenciamento completo do genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* desvendou a sequência nucleotídica de um cromossomo de 5.17 Mb, com um conteúdo de 64.7% de G+C e de dois plasmídeos: pXAC33 (33.699 pb) e pXAC64 (64.920 pb) (da Silva et al., 2002). De 4.313 ORFs anotadas, 2.710 apresentaram homologia com genes codificando para fatores conhecidos. As 1.603 ORFs restantes foram classificadas como hipotéticas, sendo que destas, 1.272 foram consideradas conservadas por

apresentarem homologia com ORFs de mesma categoria em outros organismos (da Silva et al., 2002).

A disponibilidade do genoma de Xac tem contribuído para estudos funcionais diversos nesta bactéria (Li e Wang, 2012; Guzzo et al., 2013; Huang et al., 2013). Além das homologias encontradas entre ORFs anotadas no genoma de Xac e fatores em vias metabólicas determinadas, grupos têm se valido das informações do genoma para estudar candidatos associados à patogenicidade e interação com o hospedeiro citros. O conhecimento do genoma também apoia estudos de mutagênese em larga escala utilizando-se transposons e viabiliza a identificação de ORFs/genes envolvidos em processos diversos em caracterização (Yan e Wang, 2012).

1.3 Divisão celular bacteriana

A divisão celular é um processo vital que leva à formação de duas células filhas a partir de uma célula progenitora, cada uma contendo uma cópia do material genético inerente ao organismo em questão. Este processo em qualquer ser vivo é altamente controlado (genética, bioquímica e fisiologicamente) e faz parte de um contínuo de reações que constituem o ciclo celular. Numa visão geral, células, em seu tempo característico, duplicam seu material genético, segregam cópias deste material para compartimentos definidos (separação espacial) e finalizam o processo com a separação física da célula mãe (organismos como bactérias, as células filhas são uma parcela da célula progenitora).

Em procariotos, os modelos *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* têm sido explorados com grande sucesso no estudo dos diversos passos, bem como dos constituintes que compõem a divisão bacteriana (Adams & Errington, 2009, de

Boer, 2010). Neste processo, uma estrutura, semelhante aos microtúbuloseucarióticos, organiza uma maquinaria chamada de divisomo (Goehring & Beckwith, 2005), que irá coordenar a septação com invaginação da membrana citoplasmática interna da bactéria (constricção da parede septal), e nova síntese de peptidoglicano no septo com subsequente hidrólise deste, permitindo, assim, a separação definitiva das duas células novas. Em Gram-negativos, ocorre ainda a re-estruturação de uma membrana externa (Gerding et al., 2007, Yeh, et al., 2010).

A formação do divisomo tem início com a polimerização da proteína FtsZ, um análogo funcional distante das tubulinas eucarióticas, que ocorre no citoplasma das células em divisão na organização de uma estrutura em forma de anel (anel Z), que ficará situada na região mediana das células, próximo e internamente à membrana plasmática (Lutkenhaus, 2007). A polimerização de FtsZ dependente de GTP ocorre através de sua auto-associação em protofilamentos (Mukherjee & Lutkenhaus, 1994, Lowe & Amos, 1999), que serão posteriormente ancorados à membrana mediante ação de dois outros fatores, FtsA ou ZipA (Hale & de Boer, 1997, Pichoff & Lutkenhaus, 2002). O anel Z ancorado à membrana servirá como arcabouço para o recrutamento de uma dezena de outras proteínas (essenciais) durante a progressão e término da divisão bacteriana (Goehring & Beckwith, 2005, Adams & Errington, 2009). Tais proteínas, constituintes do divisomo, são responsáveis, entre outras funções, pela invaginação de membranas, síntese de peptidoglicano e muito provavelmente pela aferição do status de processos associados como a segregação cromossômica (Barre et al., 2001, Thanbichler & Shapiro, 2006, Lutkenhaus, 2007).

Estudos de microscopia utilizando marcação com moléculas fluorescentes, bem como imuno-marcação, mostraram que em *E. coli* parece existir uma sequência linear de recrutamento dos constituintes da maquinaria de formação do septo, na

seguinte ordem: FtsZ > [FtsA, ZapA, ZipA] > (FtsE, FtsX) > FtsK > FtsQ > (FtsB, FtsL) > FtsW > FtsI > FtsN > AmiC > EnvC (Vicente et al., 2006; de Boer, 2010). Proteínas entre colchetes são independentes uma das outras, mas dependentes de FtsZ para sua localização na região mediana da célula; proteínas entre parênteses apresentam associação simultânea ao complexo. No entanto, esta linearidade de recrutamento não é observada em *B. subtilis* (revisado por Errington et al., 2003), onde as associações proteicas parecem ocorrer em dois passos: FtsA, ZapA, SepF (e provavelmente EzrA) se localizam com o anel Z e são dependentes de FtsZ para o recrutamento ao sítio de divisão; na sequência, as proteínas que se ligam à membrana DivIB (seu homólogo em *E. coli* é FtsQ ou FtsQE_c), DivIC (FtsBE_c), FtsL, PBP2B (FtsIE_c), e provavelmente FtsW, parecem ser recrutadas de forma conjunta ou cooperativa, mas não linear, sendo todas estas interdependentes para a localização no septo. Mutações ou depleções de qualquer uma dessas proteínas promovem um impedimento na associação das demais (Errington, et al., 2003). Além das 10 proteínas essenciais citadas acima e que operam na montagem do anel Z, existem ainda inúmeras outras que associadas ao divisomo operam funções das mais variadas (de Boer, 2010). Como exemplos, proteínas acessórias como ZapA (Gueiros-Filho & Losick, 2002), ZapB, ZapC e ZapD (Ebersbach et al., 2008; Durand-Heredia et al., 2011; Hale et al., 2011; Durand-Heredia et al., 2012), atuam estimulando e estabilizando a formação do anel Z, e EzrA (Levin et al., 1999) em *B. subtilis* tem a função de inibir a polimerização de FtsZ. Estas e outras proteínas acessórias serviriam para modular a formação do anel Z.

Toda a maquinaria de divisão celular do anel Z é montada na região mediana da célula em divisão. Entretanto, como o divisomo é orientado para esta região e nunca é formado nos polos? Dizemos isto porque em bactérias, de forma simplificada, as células filhas são constituídas por metade da célula mãe da geração anterior e que aumentou de

volume e sofreu um evento de separação aomeio. Nesta visão, sempre uma das extremidades de uma célula filha foi septo nageração anterior. Para controlar a montagem correta deste anel na região mediana dascélulas, evitando a formação de anel Z nos polos, existem sistemas de organizaçãotemporal/espacial e que garantem uma perfeita constrição sem fragmentação doscromossomos em processo de separação. Um destes é conhecido por sistema Noc/SlmA (Wu & Errington, 2004; Bernhardt & de Boer, 2005) que são proteínas que se ligam eprotegem diversos sítios nos cromossomos e evitam o guilhotinamento de materialgenético atuando como inibidores da formação de anel Z onde haja cromossomo. Outrosistema denominado MinCD opera no posicionamento do anel Z exatamente no meiodas células, evitando a formação de septo em outras regiões que não no meio (Hu et al.,1999; Raskin & de Boer, 1999a; Hu & Lutkenhaus, 2001). Neste ultimo, MinC é uminibidor da polimerização de FtsZ e sua localização sub-celular depende de MinD.MinD possui localização polar dependente de MinE em *E. coli* e DivIVA em *B. subtilis*(Marston et al., 1998; Raskin & de Boer, 1999b), que, de forma resumida, recruta MinCpara a região polar onde deve haver inibição da formação de anel Z.

Caloubacter crescentus, que não possui o sistema minCDE e DivIVA, possui um fatorconhecido como MipZ e que apresenta homologia a proteínas do tipo ParA que tem porfunção impedir a formação do anel em regiões diferentes do meio (Thanbichler &Shapiro, 2006). MipZ é um inibidor de FtsZ que possui localização sub-celulardependente de ParB. Por seguir ParB e consequentemente as origens de replicação ondeParB se liga durante a progressão do ciclo celular, MipZ gera uma zona quecompreende as origens localizadas nos polos celulares e a montagem do anel Z ocorre nocentro das células em divisão.Recente estudo de nosso grupo foi observadoa

existência de semelhanças entre os sistemas de segregação cromossômica e divisão celular de *Xac* e *C. crescentus* (Ucci, et al., 2014).

Xac possui em seu genoma ORFs anotadas como *minCDE* e pelo menos 5 ORFs semelhantes a *parA* (XAC0192, XAC1907, XAC2205, XAC2433 e XAC3905) (da Silva, et al., 2002). Proteínas do tipo ParA estão envolvidas com a segregação cromossômica em bactérias e operam em conjunto com seus pares ParB (Leonard et al., 2005). Assim, uma das 5 ORFs anotadas como *parA* poderia ser o parafuncional de *parB* e realmente, XAC3905 está em formação de operon com *parB* de *Xac* (XAC3906). Dentre as que restam, poderíamos ter o homólogo de MipZ de *C. crescentus*, que foi identificado em processo que demonstrou homologia a proteínas do tipo *parA* nesta bactéria (Thanbichler & Shapiro, 2006). Dada a semelhança observada em segregação cromossômica e divisão celular entre *Xac* e *C. crescentus* (Ucci, et al., 2014), *Xac* poderia ter um homólogo de *mipZ*? *Xac* utiliza os produtos das ORFs anotadas como *minCDE*?

1.4 Sistema MinCDE

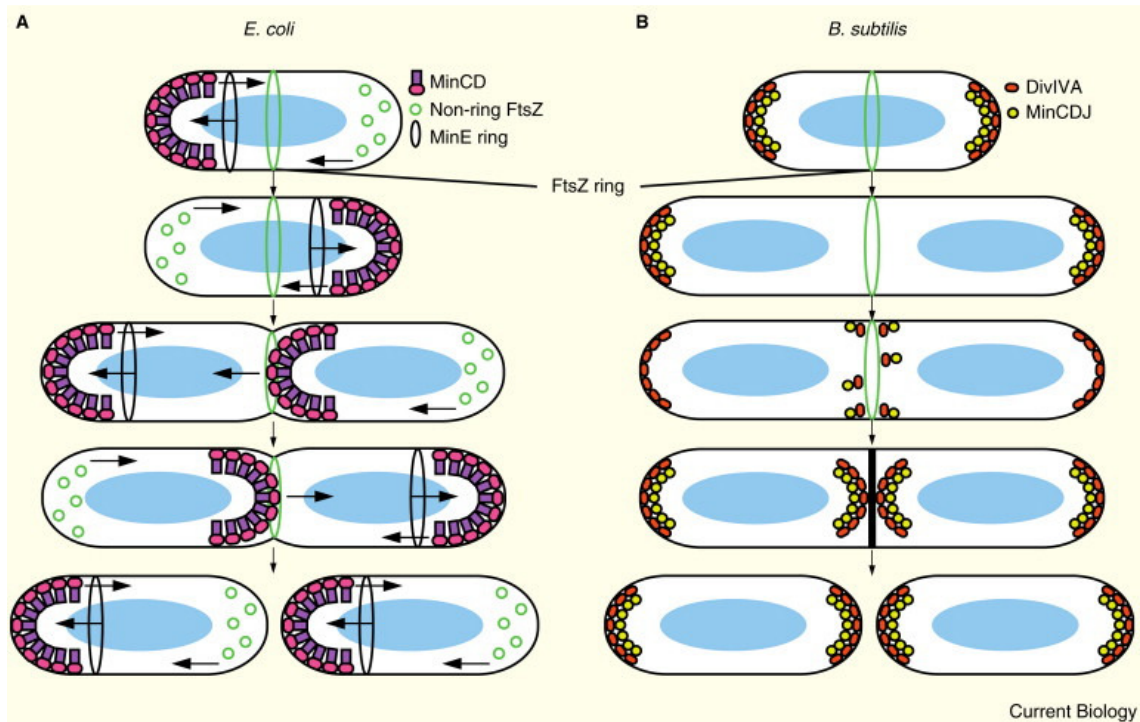
O sistema Min é o responsável pelo posicionamento central do anel Z em *E. coli* (Hu et al., 1999; Raskin & de Boer, 1999a; Hu & Lutkenhaus, 2001) e em *B. subtilis* (Edwards e Errington, 1997; Marston *et al.*, 1998). Em *E. coli*, este sistema codifica três proteínas MinC, MinD e MinE (Lutkenhaus, 2007), as quais já estão bem estabelecidas (Figura 2A). MinC é o inibidor de FtsZ; MinD é o ativador de MinC recrutando-o para a membrana e MinE é um regulador do complexo MinCD separando-os através de sua interação com MinD (Hu *et al.*, 1999; Hu & Lutkenhaus, 2003).

Foi visto que mutações nos loci *minC* e *minD* de *E. coli* levam a célula a apresentar alterações morfológicas como filamentação e minicélula, pois sabe-se que

MinC tem atividade inibidora de FtsZ e MinD recruta MinC para membrana, desta forma a célula perde o controle de septação (de Boer et al., 1989; Raskin & de Boer, 1999a; Raskin & de Boer, 1999b). Enquanto que ausência em MinE leva a célula a formação de filamento, devida a presença do complexo MinCD por toda a membrana plasmática. Assim a perda do locus por inteiro apenas causaria formação de minicélulas e não seria letal. Contudo apenas a perda de MinE seria letal pois ele removeria o controle das restrições espaciais do complexo MinCD (Maroto & Monk, 2008).

O sistema minCD aparenta ser bem conservado em grande parte das bactérias, um exemplo disso são os homólogos de *minC* e *minD* encontrados em *B. subtilis* que já foram bem caracterizados (Levin *et al.*, 1992; Varley e Stewart, 1992; Lee e Price, 1993). Um fato interessante é que *B. subtilis* não apresenta MinE como regulador espacial de MinCD mas sim a proteína DivIVA que desempenha esse papel neste organismo (Figura 2B) (Cha e Stewart 1997; Edwards e Errington 1997; Marston *et al.*, 1998). Assim como em *E. coli*, mutações em MinC e MinD podem levar a célula a expressar fenótipos típicos como minicélulas e filamentação (Marston *et al.*, 1998; Marston e Errington, 1999). E foi visto também que alterações em DivIVA leva ao mesmo fenótipo que visto em MinE (Marston e Errington, 1999), mesmo essas proteínas sendo completamente diferentes tanto em função quanto em localização (Marston *et al.*, 1998).

Figura 2. Sistema minCDE em *E. coli* e minCD DivIVA em *B. subtilis*.



(A) Em *E. coli*, MinE move-se em direção ao complexo MinC–MinD em um polo e estimula a atividade ATPase de MinD, causando que MinC e MinD movam-se para o polo oposto. (B) Em *B. subtilis*, DivIVA localiza-se nos polos celulares e liga-se a MinJ, o qual recruta o complexo MinC–MinD. Fonte Rowlett e Margolin, 2013.

1.5 Oscilação do sistema Min

Uma das características mais marcantes do sistema Min em *E. coli* é o seu alto mecanismo dinâmico de ação, que foi primeiramente descoberto por Raskin e de Boer (1999a e 1999b). Em células normais de *E. coli*, as proteínas Min estão em constante movimento no citoplasma bacteriano, oscilando de polo a polo com um gradiente de MinC concentrado nos polos e uma baixa concentração no meio da célula. Como MinC é inibidor da polimerização de FtsZ, a divisão celular fica restrita na região da célula pois onde se encontra a menor concentração de MinC (Varma et al., 2008). MinC associa-se com os filamentos helicoidais de MinD que enrolam-se na superfície interna da membrana citoplasmática, começando em um polo e estendendo para o centro da célula. MinE liga-se ao complexo helicoidal, aciona a hidrólise de MinD-ATP

para MinD-ADP e liberando MinC e MinD da membrana, que depois se difundem e acumulam no polo oposto, onde este processo é repetido (Rothfield et al., 2005; Shih e Rothfield, 2006).

Este comportamento de oscilação do sistema Min foi visto graças a fusões funcionais das proteínas com GFP (Hu e Lutkenhaus, 1999; Raskin e de Boer, 1999a; 1999b) (como podem ser vistos na Figura 2A). As marcações feitas em MinD e MinE mostram que essas duas proteínas são os componentes osciladores enquanto que MinC é apenas um passageiro. MinD é uma ATPase que dimeriza-se e liga-se à membrana na presença de ATP e MinE é um indutor da atividade ATPásica de MinD e regulador do complexo MinCD (Lutkenhaus et al., 2012). O mecanismo oscilatório tem sido elaborado e foram feitos vários modelos (Howard and Kruse, 2005; Lutkenhaus, 2007). Em *B. subtilis* o regulador do complexo MinCD é a proteína DivIVA (Marston et al., 1998). DivIVA é localizada no polo da célula pois ela apresenta afinidade por curvatura (Lenarcic R et al., 2009). O recrutamento de MinC e MinD dá através da proteína MinJ que se liga a MinD e DivIVA (Bramkamp, et al., 2008, Patrick & Kearns, 2008; Rowlett e Margolin, 2013). Devido a sua afinidade por curvatura, DivIVA ancora-se nas duas extremidades da célula e mantém um gradiente bipolar de MinC sem gasto de ATP e evitando a formação de anel Z nos polos (Rowlett e Margolin, 2013) (Figura 2B).

CAPÍTULO 2

2. Hipótese a ser testada

O sistema MinCDE de *Escherichia coli* é responsável pelo posicionamento do septo no centro da célula. Verificou-se que *Xanthomonas citris* subsp. *citri* também apresenta ORFs anotadas como *minC*, *minD* e *minE*. Sabendo disto perguntamos se *X. citri* utiliza sistema semelhante a MinCDE de *E. coli* para posicionamento do septo em divisão celular.

3. Objetivo

Estudar o papel da ORF XAC1226 (anotada como *minC*) no processo de divisão celular de *Xac*.

3.1 Objetivos específicos

1. Promover a deleção gênica da ORF supracitada e verificar se *minC* é funcional em *Xac*;
2. Avaliar a morfologia por microscopia em contraste de fase buscando indícios de defeitos na divisão celular;
3. Marcar produto de ORF de interesse com GFP para estudos de localização sub-celular de fatores *in vivo*- buscar padrões de localização semelhantes aos propostos para MinC de outros organismos e que corroborem a existência de um destes sistemas em *Xac*;
4. Avaliar alteração de virulência.

5.MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Linhagens bacterianas e cultivo

A linhagem Xac 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) utilizada no presente estudo foi asequenciada por da Silva *et al.*, 2002. *E. coli* DH5 α (*F*⁻ ϕ 80*dlacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYAargF*)*U169 deoR*, *recA1 endA1 hsdR17(rk⁻ mk⁺ phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1)* eDH10B (*F*⁻ *mcrA* *D*(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *f80lacZDM15* *DlacX74 recA1 endA1araD139 D*(*ara, leu*)*7697 galU galK l- rpsL (Str^R) nupG*) foram utilizadas para as6clonagens. Xac foi cultivada a 30° C em meio NYG com ou sem ágar (Peptona 5 g/L,extrato de levedura 3 g/L e glicerol 20 mL/L). Linhagens de *E. coli* foram cultivadas emmeio Luria-Bertani (LB) a 30 ou 37°C, acrescido ou não de ágar e contendo antibióticos (canamicina ou gentamicina; 20 μ g/mL), quando necessário (Sambrook, *et al.*, 1989).

5.2 Meio mínimo XAM1 para Xac

5.2.1 Preparo das soluções que foram utilizadas

Foi preparado uma solução estoque de sais 1000 mL de 5,0 g de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄(PM=132,14), 22,5 g de fosfato de potássio monobásico KH₂PO₄ (PM=136,09), 52,5 g de fosfato de potássio dibásico K₂HPO₄ (PM=174,18), 2,5 g de citrato de sódioNa₃C₆H₅O₇.2H₂O (PM=294,10) e autoclavado.

Estoques de MgSO₄.7H₂O 1M e Casaminoácidos (30%) foram preparados e autoclavados. Todas soluções estoques foram guardadas à temperatura ambiente. Um estoque de solução de BSA a 50 mg/mL foi filtrada em membrana de 0,22 μ m e guardada em geladeira.

5.2.2 Composição do XAM1 pH=5,4

Para prepararmos o meio XAM1, adicionamos 100 mL da solução de sais, 1 mL de glicerol, 500 µL MgSO₄.7H₂O 1M, 500 µL casaminoácidos e completado para um volume final de 500 mL com H₂O destilada e o pH foi ajustado para 5,4, em seguida o meio foi autoclavado. Depois de autoclavado e antes de usar o XAM1 foi adicionado 10 mL da solução de BSA.

5.3 Biologia Molecular

Métodos estabelecidos seguiram Sambrook et al. (1989). Extração de DNA total de *X. citri* e *E. coli*, bem como, transformação seguiram Ferreira *et al.* (1995). As extrações de DNA plasmidial e purificação de DNA de gel de agarose seguiram as instruções dos Kits Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit e Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit. As reações enzimáticas de digestão, ligação e amplificação por PCR seguiram as instruções do fabricante das enzimas utilizadas (New England Biolabs e Thermo).

5.4 Vetores de expressão

O vetor integrativo pGCD21 (Figura 3c), que possibilita a expressão de proteínas em fusão com GFP em *Xac*, teve como base o vetor pHF5Ca (GenBank FJ562210). Primeiramente, *gfp* foi removido do vetor pPM7g (Martins, *et al.*, 2010) por restrição utilizando-se as enzimas *Bam*HI/*Xba*I; o gene isolado foi ligado ao *backbone* do vetor pHF5Ca digerido com as mesmas enzimas dando origem ao vetor pGCD19 (KJ619486; ocorre remoção do *tap1479* de pHF5Ca). Na sequência, o promotor e repressor de arabinose (*araC-para*) foram removidos do vetor pEB304 (Gully, *et al.*, 2003) por PCR com os *primers*:

pARAF (5'- AAAGAATTCGCATAATGTGCCTGTCAAATG) e

pARAR (5'- TTTAGATCTTTCCTCCTGCTAGCCCCAAAAAACG)

O produto deste PCR foi digerido com as enzimas *EcoRI/BglII* e ligado ao backbone do vetor pGCD19 digerido com *EcoRI/BamHI* (ocorre remoção do promotor de xilose de pGCD19) dando origem ao pGCD21.

Ligação dos genes *minC* aos vetores de expressão:

Para ligação ao vetor pLAL1, genes foram obtidos por PCR com *primers*:

minC_pLAL1F (*EcoRI*)

5'- AAAGAATTCACCATGGCAAGTGTGAATGTGGATTTTG

minC_pLAL1R (*HindIII*)

5'- AAAAAGCTTTCAATCAAGCGCAGCGATCTTG

Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas indicadas e ligados ao pLAL1/*EcoRI/HindIII* dando origem ao pGCD1c (Figura 3b).

Para ligação ao pGCD21, genes foram isolados por PCR com os *primers*:

minC F (*NotI*)

5'- TAAGCGGCCGCGTGGCAAGTGTGAATGTGGATTTTG

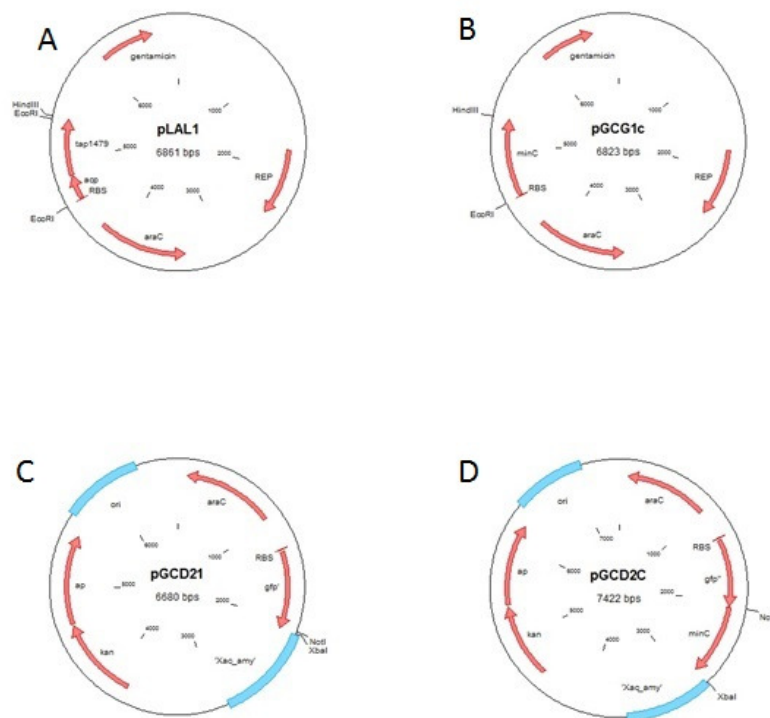
201402minC R (*XbaI*)

5'- AAATCTAGATCAATCAAGCGCAGCGATCTTG

Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas marcadas acima e ligados ao pGCD21 preparado com as mesmas enzimas; as construções codificam para GFP-MinC e deram origem ao pGCD2c (Figura 3d).

Todos os PCRs foram realizados com a enzima Pfu DNA polimerase seguindo recomendações do fabricante (Fermentas/Thermo). DNAs foram checados por sequenciamento na empresa MacroGen (Korea).

Figura 3. Mapas dos vetores de expressão



Fonte: Gráfico gerado a partir do programa Clone Manager

5.5 Knockout gênico

Fragmentos *upstream* e *downstream* às ORFs/genes que seriam deletados foram amplificados com os conjuntos de primers abaixo relacionados:

Para deleção de *minC*:

Fragmento *upstream* 870pb (*Bam*HI/*Xba*I):

***minCupF* (*Bam*HI)**

5' - AAAGGATCCGTATGACTGAGGTATCCCAACATGTC

minCupR (*Xba*I)

5' - AAATCTAGATGCCACAACCTCAGCTCCCCGTCGATG

Fragmento downstream 929pb (*Xba*I/*Hind*III):

minCdownF (*Xba*I)

5' - AAATCTAGAGATTGACGCGGCCCAACCACAGAAATATTC

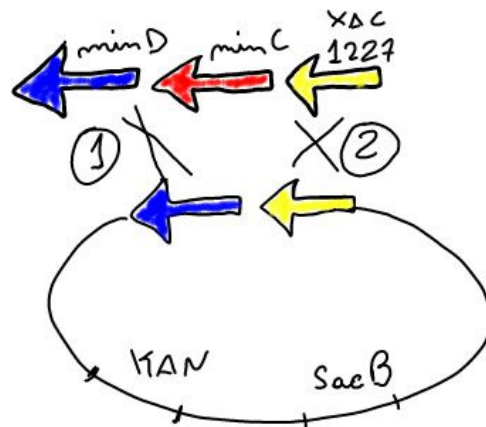
minCdownR (*Hind*III)

5' - AAAAAGCTTCAATGATGATCTGCAGGCGGTTCTTGG

Os produtos dos PCRs acima foram tratados com os pares de enzimas de restrição indicados e misturados com o vetor suicida pNPTS138/*Bam*HI/*Hind*III (LucyShapiro, vetor não publicado) para tripla ligação da seguinte forma: Exemplo de material para a deleção de *minC* = foram misturados os fragmentos *minC-upstream/Bam*HI/*Xba*I + *minC-downstream/Xba*I/*Hind*III + pNPTS138/*Bam*HI/*Hind*III. A deleção gênica é mostrada no esquema da Figura 6. A construção final foi inserida em *Xac* por eletroporação, onde normalmente é retida após integração no genoma por um dos dois eventos de recombinação homólogos mostrados (Fig. 4, eventos 1 ou 2). Mutantes carregando o vetor integrado no genoma foram selecionados em placas de meio N-agar contendo canamicina. Subsequentemente, uma colônia derivada do primeiro evento de recombinação foi cultivada por 16h em meio NYG líquido, sem canamicina, para que ocorresse o segundo evento de recombinação (troca alélica). Após o cultivo, células foram plaqueadas em meio NYG ágar sem canamicina contendo 5% de sacarose. Nesta fase, somente células onde tenha ocorrido um segundo *crossing-over* (conclusão da troca alélica ou reversão para selvagem com a saída do vetor), e que tenham perdido o vetor que porta o gene *sacB*, poderão se desenvolver, pois o produto

deste gene, levanosucrase, metaboliza asacarose em um produto tóxico para Gram-negativos (Reyrat, et al., 1998).

Figura 4. Esquema de deleção limpa para *minC*.

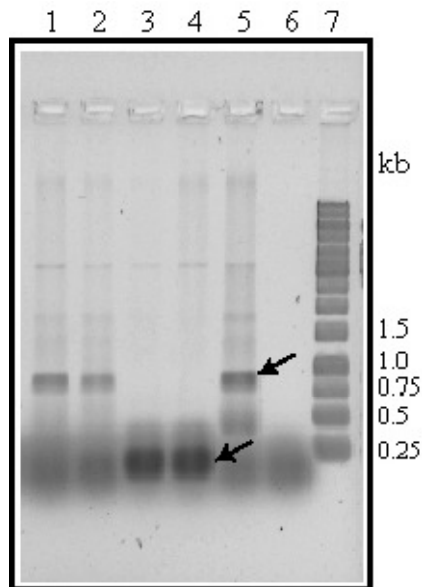


As ORFs *minD* e XAC 1227 (azul e amarelo, respectivamente) de *Xac* foram amplificadas individualmente por PCR e ligadas conforme o esquema acima em um vetor suicida contendo um gene para resistência a canamicina (*kan*) e o gene *sacB* de *B. subtilis*. Este vetor foi inserido em *Xac* e mediante dois eventos de recombinação homóloga (1 e 2) promoveu a retirada da região de *minC* (vermelho) do cromossomo bacteriano.

Para a obtenção da deleção de *minC* em *Xac*, o vetor de expressão replicativo pGCD1c. Foram feitas várias tentativas de obter um mutante *Xac*Δ*minC* porém todas em vão, pois não se conseguiu resgatar mutantes sem que houvesse a complementação com pGCD1c. Após transformação de *Xac*/pGCD1c com o vetor de deleção e seleção de candidatos de recombinação em meio com sacarose, um PCR diagnóstico foi realizado para a presença de *minC* (Figura 5). Nas canaletas 3 e 4, os produtos de PCR foram condizentes com a falta da região codificando para MinC nestes candidatos (compare com o fragmento contendo *minC* em 5; controle *Xac* selvagem). Na sequência, três mutantes para *minC* foram selecionados (*Xac*Δ*minC*/pGCD1c), para análise de viabilidade em curva de crescimento em meio

complexoNYG e o mutante de número 24 foi escolhido para prosseguir com as análises (Figura 6).

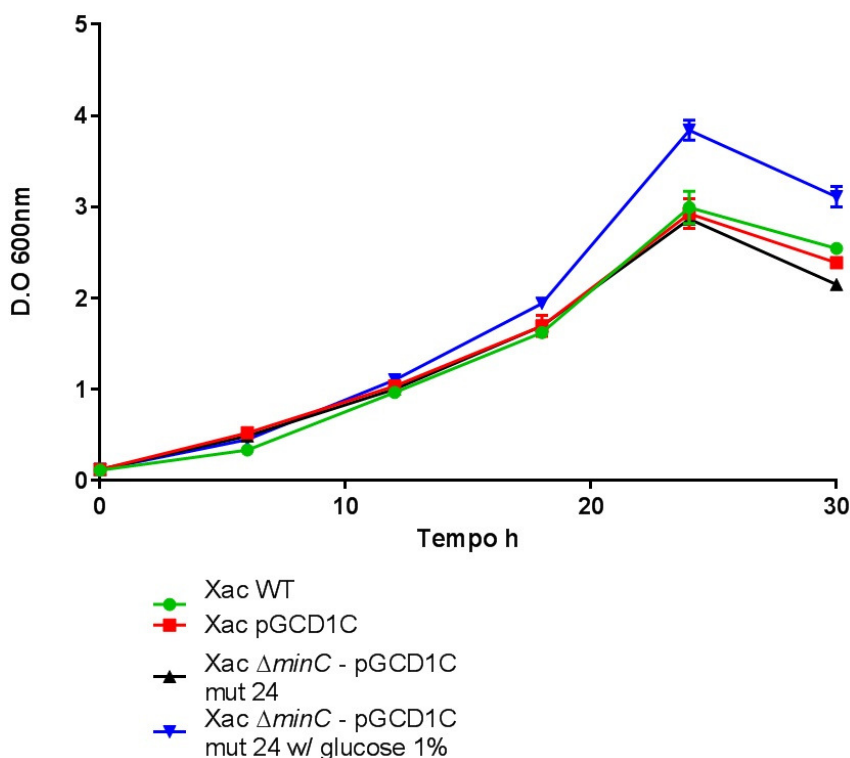
Figura 5. PCR diagnóstico para deleção de *minC* em *Xac*.



Gel de agarose mostrando produtos de PCR diagnóstico para deleção de *minC*. Canaletas 1-4) candidatos mutantes, 5) *Xac* selvagem, 6) branco, 7) marcador de peso molecular. Setas indicam produto referente a *minC* (5) e ausência de *minC* (3 e 4).

As células foram cultivadas em meio NYG contendo gentamicina e mutante 24 (linha azul) foi crescido em mesmo meio contendo glicose 1% ocasionando o trancamento do promotor no vetor pGCD1c, mas como pode ser observado na figura 8 a adição da glicose no meio serviu como uma fonte extra de carbono favorecendo um crescimento melhor do que em *Xac* WT (linha verde na figura 8).

Figura 6. Curva de crescimento do mutante 24.



Curva de fitness do mutante 24 em relação a XAC WT. Células foram cultivadas em meio NYG por 30h com amostras retiradas a cada 6h para leitura de D.O._{600nm}.

5.6 Amplificação para clonagem e diagnóstico

Para a amplificação das sequências foram usados DNA plasmidial (5 nanogramas) ou DNA genômico (20ng), tampão da enzima Pfu DNA polimerase para 1X final (Thermo, contendo 2 mM de MgCl₂), 100 μM de cada dNTP, 1U Pfu, 1 μM de cada primer e água para 20 μl finais. O ciclo de amplificação para a sequência *gfp* foi “touch down” : desnaturação inicial a 94 °C/4’30”, seguido de 3 ciclos de 94 °C/30”, 68 °C/30”, 70 °C/4’30”e depois mais 30 ciclos de 94 °C/30”, 62 °C/30” e 70 °C/4’30”.

Para amplificação de *minC* (sequência com alto conteúdo de GC), foi acrescentada na reação formamida desionizada na concentração de 5% final. O ciclo de amplificação foi “touch down” : desnaturação inicial a 94 °C/2’30”, seguido de 4 ciclos de 94 °C/30”, 68 °C/30”, 70 °C/2’e depois mais 30 ciclos de 94 °C/30”, 60 °C/30” e 72 °C/2’.

5.7 SDS-PAGE e Western Blotting

Para preparação do extrato de proteínas totais, adicionou-se tampão de amostra contendo SDS, na proporção de 90 μ L para cada 20 mg de massa celular, quando então as amostras foram fervidas a 100 °C por 5 min e centrifugadas para remoção de restos celulares (SAMBROOK et al., 1989). SDS-PAGE, coloração com coomassie e transferência de proteínas para membrana de PVDF seguiram Sambrook et al., (1989).

Para detecção de GFP na membrana de PVDF (GE®), foi utilizado anticorpo primário anti-GFP (Sigma G1544) produzido em coelho em seguida um anticorpo secundário anti-coelho contendo uma peroxidase. Reação de quimioluminescência seguiu as recomendações contidas no kit ECL.

5.8 Microscopia

Linhagens foram cultivadas a 30°C e observadas em D.O_{600nm} ~0,4 após imobilização em lâminas contendo agarose 1% em PBS 1X. Preparação das lâminas: cerca de 1000 μ L da solução de agarose foi dispensada em lâminas de microscopia óptica e sobre as quais foi colocada outra lâmina para que o gel de agarose formasse um filme fino e de altura homogênea. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, por aproximadamente 5 min e abertas somente no momento do uso, quando 10 μ L da suspensão de células foram depositadas no centro destas e cobertos com lamínula. As células foram visualizadas utilizando-se o microscópio Olympus BX61, equipado com câmera monocromática OrcaFlash2 (Hamamatsu). Análises de imagens foram realizadas com software CellSens (Olympus).

5.9 Teste de patogenicidade

Testes de patogenicidade foram realizados utilizando-se como hospedeiro laranja doce cultivar “Pera”. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação. As células a serem testadas foram cultivadas até que atingissem D.O._{600nm} ~0,5, seguindo-se infiltração de aproximadamente 100 µL de suspensão de células (ou diluições) em regiões entre nervuras das folhas nas superfícies abaxiais, com a utilização de seringas hipodérmicas (1mL) contendo agulhas. Os sintomas de lesão foram identificados por alterações nos locais de inóculo em comparação com sintomas causados pela linhagem selvagem (controle positivo). Observações foram realizadas por três semanas.

CAPÍTULO 3

A Protein Expression System for Tandem Affinity Purification in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

G.C. Dantas¹, P.M.M. Martins¹, D.A.B. Martins², E. Gomes³, H. Ferreira¹

1 Depto. de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, SP, 13500-900, Brazil;

2 Depto. de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, R. Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara, SP, 14800-060, Brazil;

3 Depto. de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São Jose do Rio Preto, SP, 15054-000, Brazil

A partir deste artigo foram feitos os vetores integrativos utilizados para expressão de GFP-MinC.



BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

<http://www.bjmicrobiol.com.br/>

Genetics and Molecular Microbiology

A protein expression system for tandem affinity purification in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*Giordanni C. Dantas^{a,1}, Paula M.M. Martins^{a,1}, Daniela A.B. Martins^b, Eleni Gomes^c, Henrique Ferreira^{a,*}^a Depto. de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, SP 13500-900, Brazil^b Depto. de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, R. Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara, SP 14800-060, Brazil^c Depto. de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São Jose do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2015

Accepted 23 October 2015

Available online xxx

Associate Editor: Solange Ines Mussatto

Keywords:

Citrus canker

Expression vectors

TAP-tag

ABSTRACT

Citrus canker, caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), is one of the most devastating diseases to affect citrus crops. There is no treatment for citrus canker; effective control against the spread of Xac is usually achieved by the elimination of affected plants along with that of asymptomatic neighbors. An in depth understanding of the pathogen is the keystone for understanding of the disease; to this effect we are committed to the development of strategies to ease the study of Xac. Genome sequencing and annotation of Xac revealed that ~37% of the genome is composed of hypothetical ORFs. To start a systematic characterization of novel factors encoded by Xac, we constructed integrative-vectors for protein expression specific to this bacterium. The vectors allow for the production of TAP-tagged proteins in Xac under the regulation of the xylose promoter. In this study, we show that a TAP-expression vector, integrated into the *amy* locus of Xac, does not compromise its virulence. Furthermore, our results also demonstrate that the polypeptide TAP can be overproduced in Xac and purified from the soluble phase of cell extracts. Our results substantiate the use of our vectors for protein expression in Xac thus contributing a novel tool for the characterization of proteins and protein complexes generated by this bacterium *in vivo*.

© 2016 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail: henrique.ferreira@linacre.oxon.org (H. Ferreira).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.026>

1517-8382/© 2016 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Citrus canker, one of the most important diseases affecting citrus crops worldwide, is caused by a Gram-negative bacterium, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). The complete genome sequence of Xac, which was reported more than a decade ago,¹ has significantly contributed to improving our understanding of the molecular processes of this plant pathogen.²⁻⁵ Of the 4313 Xac ORFs that have been annotated, nearly 63% exhibit homology to genes of known function whereas ~37% correspond to hypothetical ORFs that could potentially code for novel polypeptides.¹ Such a distribution pattern of ORFs is a common feature in microbial genomes and it is hypothesized that a significant amount of information regarding adaptation and pathogenicity may be encoded within such hypothetical proteins. The biggest challenge in characterizing these hypothetical ORFs is that the phenotypes generated by them are usually unknown.

Among techniques that have the potential to be used for the characterization of hypothetical proteins we cite: two dimensional (2-D) protein gels allied to mass spectrometry, DNA microarrays, and next generation sequencing of nucleic acids (NGS).⁶⁻¹⁵ All of these methods allow for high-throughput processing of candidate genes/proteins and the data obtained by analyzing patterns of co-expression and co-repression (exhibited by a particular gene/polypeptide during different growth or development conditions) in turn helps in the attribution of function. In addition to the aforementioned techniques, *in vivo* protein localization via fluorescence microscopy has also proven to be a powerful tool for annotating function to unknown protein factors.^{16,17} However, the most promising techniques in this field are those that are capable of demonstrating a direct contact between hypothetical proteins and (an) other cellular factor(s). One such method is the yeast-two-hybrid (YTH) technique and its variant the bacterial-two-hybrid (BTH) system.^{18,19} One of the first major successes of the YTH system was the construction of a complex protein-protein interaction map of the human pathogen *Helicobacter pylori*.²⁰ In Xac this method has been applied for the identification and characterization of several previously unknown protein components of the type III and IV secretion systems.^{2,3} In spite of the obvious value and utility of the YTH technique, the methodology suffers from certain serious disadvantages such as the need to construct a genomic/cDNA expression library of the organism under study. Another technique, an interesting alternative to the YTH/BTH methods, is the Tandem Affinity Purification strategy (TAP-tagging).^{21,22} TAP-tagging was developed to aid in the purification of active macromolecular complexes from yeast; it differs from the two-hybrid systems in the aspect that it does not require the construction of protein expression libraries to be screened with baits. The basis of TAP-tagging is the expression of a fusion-protein comprising of the protein of interest fused to a TAP-tag either at the C- or the N-terminus. Expression of this fusion protein inside a cellular environment wherein the expression of the protein under study is indigenous causes the TAP-tagged protein to interact with other cellular factors in the same fashion as an untagged protein would. Following cell propagation, protein complexes comprising of

TAP-protein fusion and their associated cellular factors are to be purified and identified by mass spectrometry. The Tap-tagging technique has been successfully adapted to a variety of organisms including the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.²³⁻³⁵

Herein, we describe a protein expression system for tandem affinity purification in Xac (TAP expression vectors). The vectors involved in this system have the capability to stably integrate into a specific genomic region (the *amy* locus) of Xac without altering pathogenicity or virulence. Finally, we expressed and purified the TAP-tag from Xac, corroborating the use of our expression vectors for protein studies in this bacterium.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The *X. citri* subsp. *citri* used in the study^{36,37} was the sequenced strain 306.¹ *Escherichia coli* strain DH10B (F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1* *endA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* λ -*rpsL* (Str^R) *nupG*) was used for cloning. DH10B was cultivated at 37 °C in LB³⁸ and Xac at 30 °C in NYG (Peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L and glycerol 20 g/L). For the amylase tests, soluble starch was added to NYG-agar at a final concentration of 0.2%. During the cloning procedure, ampicillin (20 μ g/mL) and kanamycin (10 μ g/mL) were added to the media to allow for selection of plasmid-carrying colonies.

General methods

Basic molecular biology experiments were conducted as per prescribed protocols.³⁸ Electrotransformation of Xac was performed as described previously.³⁹ DNA polymerases and restriction and modifying enzymes were obtained from Fermentas (Thermo Scientific). The construction of pHF5Ca (GenBank FJ562210) has been previously described in the literature⁴⁰; pHF5Na (GenBank FJ573043) is a variant of pHF5Ca in which the *tap1479* has been replaced by the *tap1761*²¹ (Fig. 1A). The *tap1761* cassette was isolated by PCR using pBS1761 as template²¹ and the primer pair PBS1761F 5'-TGA GGA TCC ATG ATA ACT TCG TAT AGC ATA C and PBS1761R 5'-TCA TTC TAG ACT ATA GGG CGA ATT GGG TAC C. Following PCR, the purified fragment was digested with *Bam*HI/*Xba*I and ligated to the backbone of pre-digested pHF5Ca. For detecting the presence of pHF5Ca integrated into the Xac genome diagnostic PCR was performed. The primer pair used for this purpose was: pxyl 5'-GTA CTT ACT ATA TGA AAT AAA ATG and 1479R 5'-ATC AAG CTT CAG GTT GAC TTC CCC G.

Protein expression

Strains of *E. coli*/pHF5Ca and Xac *amy::pHF5Ca* were activated by the inoculation of 2–3 isolated colonies in 3 mL of LB or NYG, respectively, along with the required antibiotics. The inoculums were cultured for 8 h at 30 °C and 180 rpm. At the end of the designated growth period, the cultures were diluted 1:50 (*E. coli*) or 1:10 (Xac) in Erlenmeyer flasks containing 50 mL LB or NYG broth plus antibiotics. Cultures were grown for 14 h at

30 °C and 180 rpm. At the end of the time period, strains were again diluted 1:50 (*E. coli*) or 1:10 (*Xac*) in Erlenmeyer flasks containing 50 mL LB or NYG broth (for Western blotting) or 500 mL LB or NYG (for protein purification). Cultures were incubated at 30 °C and 180 rpm till an OD₆₀₀ value of 0.5 was reached. For induction of protein expression, xylose was added to the growth medium to a final concentration of 0.5%; time period for induction was 1 h (*E. coli*) and 4 h (*Xac*) using conditions identical to those employed for culture growth. Subsequent to induction, cells were harvested by centrifugation at 4000 × *g* for 10 min followed by washing with cell wash buffer (30 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl); cell pellets were stored at –80 °C till use.

Western blotting

Total protein extracts were prepared by resuspending 20 mg of each cell pellet in 100 µL of SDS-sample buffer. Sample processing, SDS-PAGE, and transfer to PVDF membrane was conducted using standard methodology.³⁸ For detection of the immobilized TAP-tag, the PVDF membrane was washed with PBS-Tween-20 (0.2%) containing 5% skimmed milk and incubated with a secondary antibody coupled to HRP (rabbit Anti-Horse IgG; SIGMA A6917) in a dilution of 1:3000. The principle underlying this methodology is that Protein A, which is part of the TAP-tag, is known to bind IgG isotypes directly. Following incubation with the antibody, the

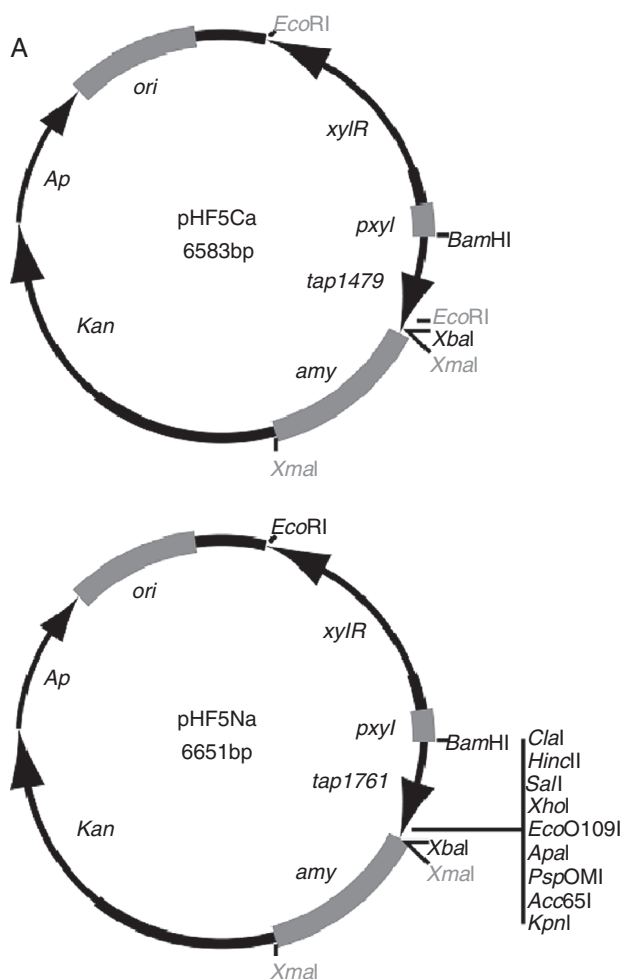


Fig. 1 – Expression vectors for Tandem Affinity purification in *Xac*. (A) Schematic representation of pHF5Ca and pHF5Na: the protein expression vectors for TAP-tagging in *Xac*. Each vector carries a different TAP-coding DNA, *tap1479* and *tap1761* respectively, which produce TAP fusions to either the C- or N-terminal ends of proteins under study. Both vectors are based on the pCR2.1-TOPO backbone which carries a pUC replication origin and DNA cassettes for ampicillin (Ap) and kanamycin (kan) resistance. (B) DNA sequence of the xylose promoter region common to pHF5Ca and pHF5Na showing the location of the ribosome binding-site (RBS) and the start codon (ATG). (C) The DNA sequences of the 3'-ends of *tap1479* and *tap1761*. Underneath each sequence is the schematic view of the protein fusion that can be produced using the tag. Note that the organization of the modules that compose the TAP-tags (CBP, TEV, and ProtA) differ with respect to TAP1479 and TAP1761 (see text); for the C-terminal fusions, the TAP1479 has ProtA located at the extreme C-terminus of the polypeptide, while ProtA is at the beginning of the protein in the N-terminal fusions. Unique restriction sites for DNA cloning are shown in black; non-unique sites in gray. CBP, calmodulin binding-protein; TEV, Tobacco Etch Virus Protease recognition sequence; ProtA, Protein A from *Staphylococcus aureus*; and EK, enterokinase recognitions sequence (DDDDK, present only in TAP1761); *pxyl*, xylose promoter; *xylR*, the xylose repressor gene; *amy*, an 800bp fragment of the alpha-amylase gene from *Xac*.



Fig. 1 – (Continuación)

western blot was developed by immersing the membrane in ECL detection reagents (Amersham ECL Western Blotting System kit-GE). The chemiluminescence produced was captured on X-ray film (Hyperfilm, GE) for further analysis.

Protein purification

Cell pellets obtained from 500 mL cultures were dissolved in pre-chilled 10 mL TST (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) containing a one-fourth of a tablet of EDTA-free protease inhibitors (Roche 1.873.580). Cells were lysed by sonication using a Vibra-Cell VCX 130 (Sonics) (10 pulses of 10 s each with intervals of 1 min) and the sonicated samples were then centrifuged at $48,000 \times g$ for 30 min at 4°C. Batch binding of proteins to the affinity resin was done by incubating the clarified suspensions with 500 µL of IgG-Sepharose (previously equilibrated in TST; GE 17-0969-01) on an ice bath with gentle agitation through a rotary shaker (120 rpm). After a 2 h incubation, resin was transferred to a 10 mL disposable column (Poly-prep BioRad 731-1550) and washed 3–4 times with 20 column-volumes of TST using

gravity flow. Samples of 100 µL were collected throughout the process for SDS-PAGE analysis. The TAP-tag was released from the resin by acid elution using 0.5 M acetic acid (pH 3.4; adjusted with 10 M ammonium acetate). Eluate fractions of 1 mL each were precipitated using TCA (3% final) and centrifuged for 10 min using a microcentrifuge at maximum speed; protein pellets were washed once with absolute ethanol and then dissolved in 100 µL of SDS sample buffer for SDS-PAGE.

Pathogenicity tests

The plant host used for this study was the sweet orange cultivar 'Bahia' (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Orange trees were cultivated under green-house conditions. Cells to be tested were cultivated in the appropriate medium until OD_{600} reached ~ 0.6 ($\sim 10^8$ CFU/mL). Subsequent to growth, cell suspensions or dilutions were used to inoculate leaves on the abaxial surface with the help of hypodermic syringes (1 mL) fitted with needles. Symptoms were observed in the course of three weeks from the day of inoculation.

Results

The TAP expression vectors for Xac

In this study, the two TAP expression vectors used for Xac, pHF5Ca and pHF5Na, carry the xylose promoter (*pxyl*), the xylose repressor (*xylR*), and the TAP encoding sequences *tap1479* or *tap1761* (Fig. 1A). These components are separated by a short stretch of DNA containing a Ribosome Binding Site (RBS) whose sequence is a consensus for both *Bacillus subtilis* as well as *E. coli*⁴¹ (Fig. 1B). The xylose promoter used has been previously evaluated by our group in Xac and found to function satisfactorily.^{17,40} The two TAP sequences, *tap1479* and *tap1761*, encode for tags used in Tandem Affinity Purification of protein complexes and are composed of three components (Fig. 1C): (a) Two domains of Protein A (ProtA; *Staphylococcus aureus*) that is known to have a strong affinity for IgG; (b) A peptide that binds calmodulin (CBP); (c) A short peptide stretch containing the recognition sequence for the protease TEV (Tobacco Etch Virus) separating the above mentioned components.^{21,22} The expression vectors pHF5Ca and pHF5Na differ only in the TAP-tags that they encode; pHF5Ca carries the *tap1479* and is used for the expression of protein fusions containing the peptide TAP1479 at the C-termini whereas the pHF5Na carries the *tap1761* and is used to produce fusions of TAP1761 to the N-termini of proteins of interest. Additionally, both the vectors used are integrative as they carry the *amy106-914* fragment of Xac which drives their integration into the *amy* locus of the bacterium via a single crossover event. Upon integration, the *amy* gene of Xac is disrupted and the bacterium becomes incapable of degrading starch.

Xac mutants harboring the TAP expression vectors colonize citrus

In a previous study, we demonstrated that Xac mutant strains carrying the GFP expression vectors pPM2a or pPM7g integrated into the *amy* locus were capable of inducing disease symptoms in citrus plants.¹⁷ Herein, in continuation of the previous study, we wanted to evaluate if the presence of the TAP coding DNA altered or affected the virulence/pathogenicity associated with Xac. To test this hypothesis, pHF5Ca was electroporated into Xac; and *kan*^R transformants (candidates potentially carrying the vector pHF5Ca) were selected for further characterization. To certify that the TAP expression vector had integrated into *amy* locus, a set of putative mutants were tested for their ability to degrade starch on a test plate.¹⁷ The results clearly demonstrated that the candidate mutants were deficient in starch degradation hence proving that pHF5Ca was stably integrated into the *amy* locus of Xac such that these mutants were unable to produce alpha-amylase (data not shown). Alongside the starch degradation test, we also carried out diagnostic PCRs on a selection of six *kan*^R mutants so as to certify the presence of pHF5Ca (Fig. 2). The diagnostic PCRs detected a DNA fragment of ~640 bp corresponding to the *tap1479* in all the mutants analyzed (compare lanes 2–7 with the positive control in lane 8 wherein pHF5Ca was used as DNA template). No

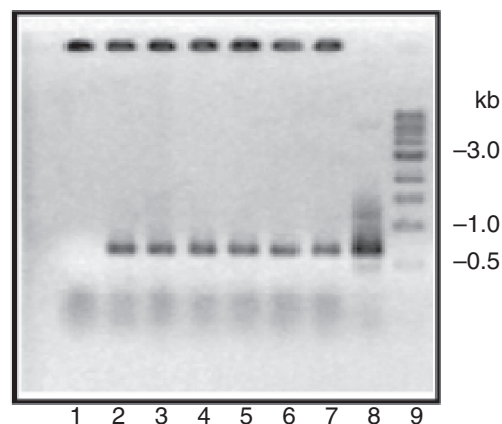


Fig. 2 – Colony PCR to detect the presence of pHF5Ca integrated into the chromosomal DNA of Xac. Subsequent to electrotransformation of Xac with the expression vector pHF5Ca, six *kan*^R mutants were selected and subjected to colony PCR using the primers PBS1479F/R specific for the amplification of the *tap1479* (approximately 640 bp). The PCR amplicons were visualized after migration through a 0.7% agarose gel. Lane: 1, WT Xac (negative control); 2–7, the six selected mutants; 8, PCR using pHF5Ca as the DNA template (positive control); and 9, DNA molecular weight marker (1 kb DNA ladder, NEB).

bands were detected in the negative control (lane 1, wild type Xac).

In order to verify if Xac *amy*::pHF5Ca was capable of causing disease symptoms in a susceptible host, two independently selected mutants were inoculated into leaves of sweet orange (Fig. 3A–C). Seven days post-inoculation, the borders of the area inoculated with Xac clearly exhibited the typical water-soaking symptom associated with the disease (Fig. 3D–F). These areas developed brownish canker-like lesions during the course of the next three weeks (data not shown). A point to note is that the mutant strains displayed the same distinct lesion pattern as the wild type. In contrast, the area inoculated with NYG-medium (negative control) showed only a mild chlorosis. In summary, the results obtained in this study clearly demonstrated that the ability to cause disease remained unaffected following integration of the Xac *amy*::pHF5Ca mutants.

TAP-tag expression

The production of a TAP-tag can be detected in Western blotting assays by exploiting the ability of ProtA to bind to the IgG antibody.⁴² A strain of *E. coli* carrying pHF5Ca (multicopy) vector and two Xac *amy*::pHF5Ca mutant strains (harboring a single copy of the expression cassette integrated into the *amy* locus of Xac) were cultivated and induced with xylose. Total protein extracts were separated by SDS-PAGE (Fig. 4A) and transferred onto a PVDF membrane so as to facilitate detection of TAP1479 using antibody reactions. The bands of the size expected for the TAP1479 (~21 kDa) were detected for both the mutant strains of Xac as well as for *E. coli* transformed with pHF5Ca (Fig. 4B, lanes 1–2, and 5–8). The results also showed

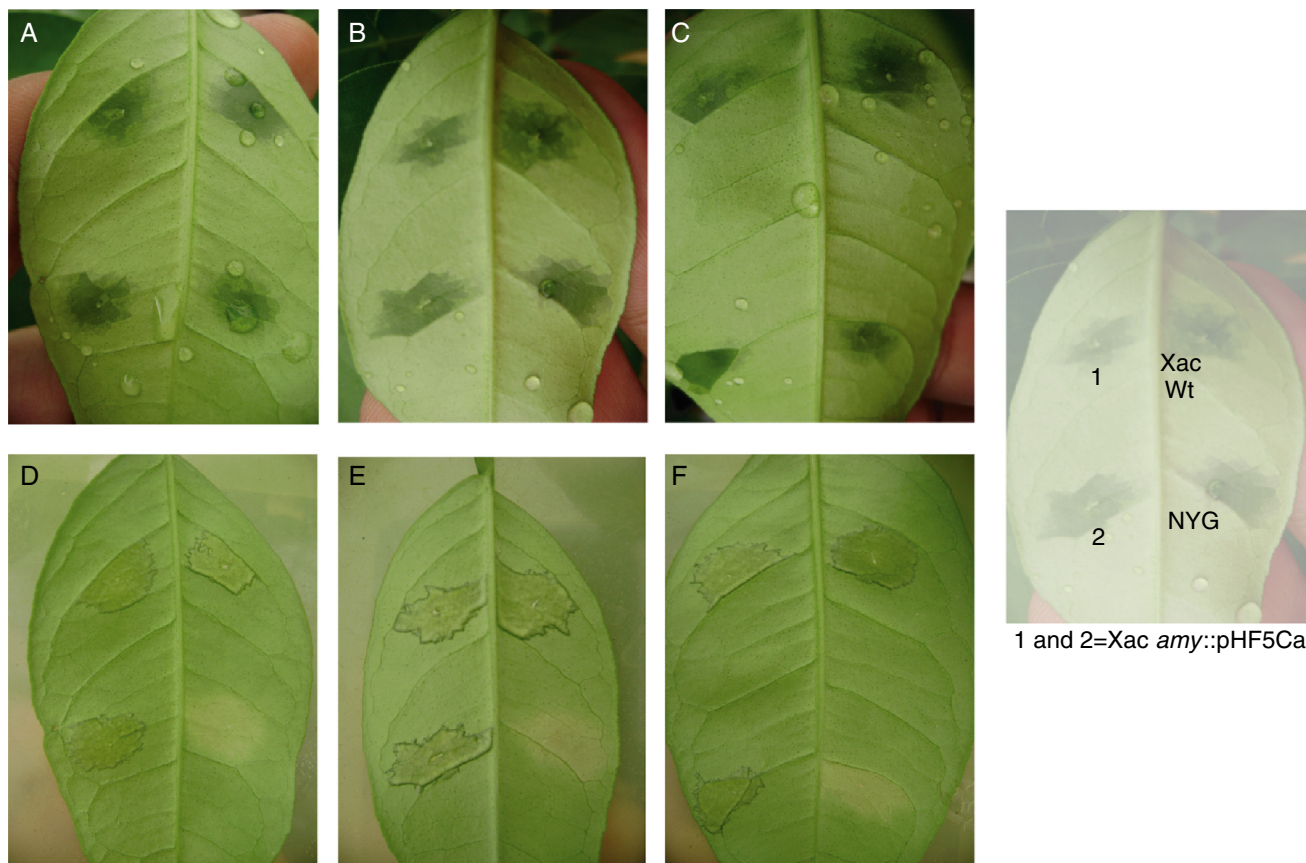


Fig. 3 – The integration of the TAP expression system into the chromosome of *Xac* does not alter its pathogenicity. Two independently selected mutants of *Xac amy::pHF5Ca* (1 and 2) were inoculated into leaves of sweet orange Bahia alongside the wild type strain (*Xac wt*) and a sample of NYG-medium (negative control). A map of the inoculation is shown on the right-hand side of the figure. Pictures were taken immediately after inoculation (A–C) and also 7 days post-inoculation (D–F). The test was conducted in triplicate (A–C).

that the production of TAP1479 was responsive to induction by xylose (lanes 1 and 2, 5 and 6, 7 and 8). For the negative control, wild type *Xac*, no signal corresponding to the band size of TAP1479 was detected (lanes 3 and 4). It was observed that *E. coli* produced more of the tag than the *Xac* mutants, a result that is consistent with the multicopy condition of pHF5Ca in *E. coli*. The results obtained clearly show that the expression system is functional in both bacteria and also that an intact and active ProtA moiety was produced in *Xac*.

Purification of the TAP-tag from *Xac*

The TAP-tag detected in the previous section appeared to be a resilient polypeptide capable of retaining the property of IgG-binding even after treatment with SDS and boiling as is mandatory for sample preparation in SDS-PAGE electrophoresis. However, results obtained by western blotting do not guarantee function, as the positive outcome can easily be explained as a byproduct of residual IgG binding activity of ProtA. Additionally, for the protein complexes produced in *Xac* to be useful, it is essential to check if the TAP1479 could be produced in larger amounts and in a soluble form. In order to evaluate this, an attempt was made to purify TAP1479 by affinity separation. An *E. coli* strain carrying pHF5Ca and a *Xac*

amy::pHF5Ca mutant were cultivated and induced with xylose. Following expression of the TAP-tag, cells were lysed by sonication and clarified cell extracts were subjected to affinity chromatography using IgG-immobilized resin. TAP1479 was successfully purified from the soluble phase of both extracts (Fig. 5; see arrows). As observed in the Western blotting experiments, *E. coli* produced a relatively higher amount of the tag (a tag concentration of ~1.4 mg/mL was estimated for the sample in lane 8) as compared to the yield from *Xac* (~0.2 mg/mL, lane 7). However, the amount of tag produced by *Xac*, though less, should suffice for mass spectrometry identification. The contaminant bands above the TAP1479 represent denatured human IgG which was stripped out from the matrix by the acid elution together with other bacterial proteins that might be interacting with the resin. These results corroborate the use of the expression vectors pHF5Ca and pHF5Na as integration/protein expression systems for TAP-tagging in *Xac*.

Discussion

In the present work we characterized a novel protein expression system intended for high-throughput analysis of protein complexes in *Xac*. These vectors are integrative and allow

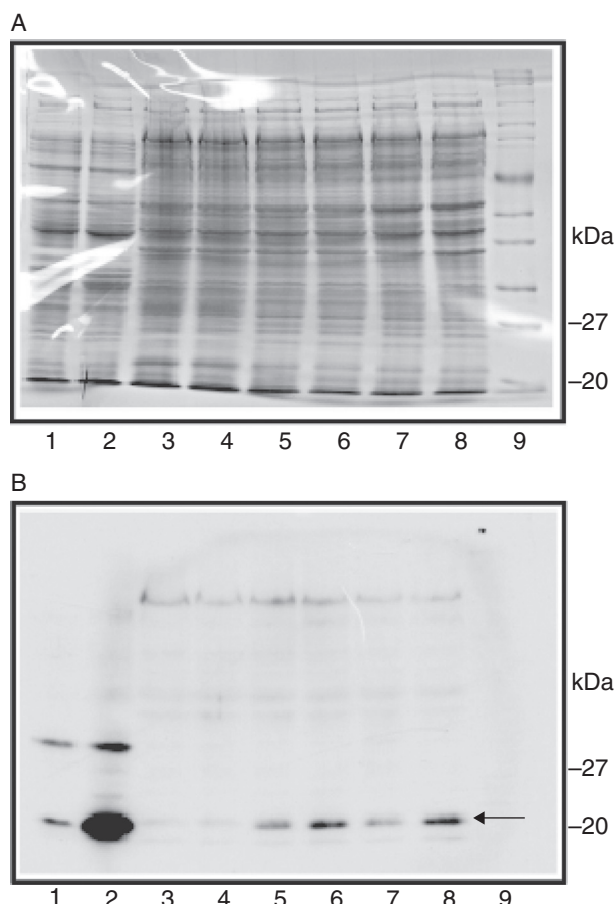


Fig. 4 – Western blotting analysis to detect expression of TAP1479 by *Xac amy::pHF5Ca* mutants. The functionality of the TAP expression system was verified by the ability of an *E. coli* DH10B strain, with pHF5Ca and *Xac kan^R* mutants, carrying the vector integrated into the chromosome, to produce the TAP1479 (approximately 21 kDa) (details of the induction procedure have been described in “Materials and methods” section). (A) Coomassie blue-stained 10% SDS-PAGE showing the separation of proteins from cell extracts of *E. coli* and *Xac*; lanes: 1, *E. coli*/pHF5Ca; 2, *E. coli*/pHF5Ca + 0.5% xylose; 3, *Xac* (WT); 4, *Xac* WT + 0.5% xylose; 5, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 1; 6, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 1 + 0.5% xylose; 7, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 2; 8, *Xac amy::pHF5Ca* mutant 2 + 0.5% xylose; and 9, protein molecular weight marker. (B) X-ray film displaying bands detected by the Western blotting analysis. Proteins in a replica of the gel shown in A were transferred to a PVDF membrane and exposed to a secondary antibody coupled to HRP. Lanes are the same as in (A). The position of the TAP1479 is marked with a black arrow on the right hand side of the film.

for the production of fusion proteins tagged with the TAP-tag either at the C- or at the N-terminal ends.^{21,22} Integration of the expression vectors into the chromosome of the bacterium may occur site-specifically into the *amy* locus (as shown here) or into the ORF as demonstrated previously in a preliminary characterization of pHF5Ca.⁴⁰ Integration mediated by a

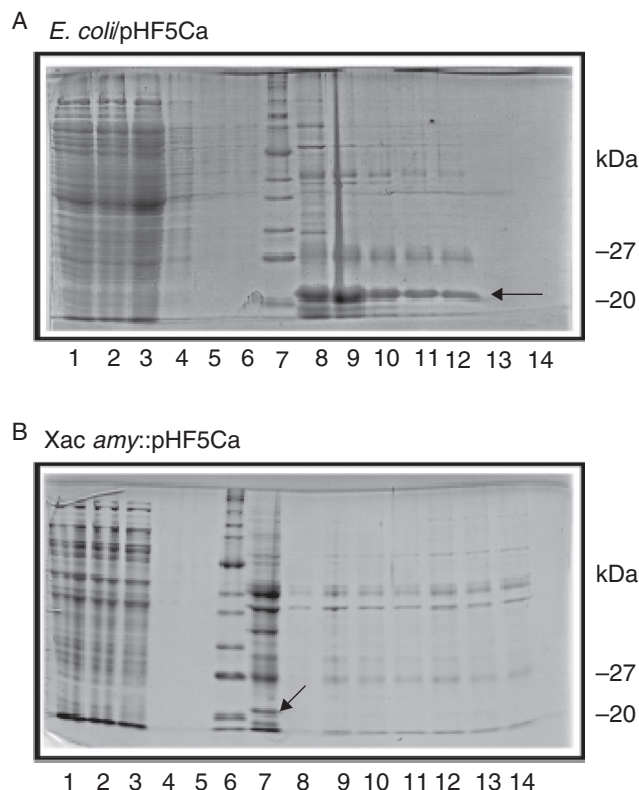


Fig. 5 – Purification of TAP1479 from *E. coli*/pHF5Ca and *Xac amy::pHF5Ca*. *E. coli* DH10B carrying pHF5Ca and a *kan^R* mutant of *Xac* harboring pHF5Ca integrated into its chromosome were induced for the production of the TAP1479. Following expression, cells were lysed and protein extracts subjected to affinity chromatography through IgG-sepharose. (A) *E. coli*/pHF5Ca; and (B) *Xac amy::pHF5Ca*, Coomassie blue-stained 10% SDS-PAGE showing the separation of proteins from the fractions collect throughout the process. (A) lane: 1, clarified lysate; 2, flow through; 3–6, washes (20 column-volumes each); 7, protein molecular weight marker; 8–14, elution fractions. (B) Lane: 1, clarified lysate; 2, flow through; 3–5, washes; 6, protein molecular weight marker; 7–14, elution fractions. The position of the TAP1479 is marked with black arrows in both gels.

crossover between ORFs (ligated in the vector and its chromosomal copy) puts the expression of the TAP-tagged peptide under the control of the native promoter of the chromosomal ORF. Hence, use of pHF5Ca is recommended so as to have a C-terminal TAP-tagged protein. The integration into the *amy* locus is the preferable site of integration as it eliminates the possibility of perturbations of chromosomal regions containing the ORFs under investigation. Genome integration also guarantees that the expression cassette will be propagated as a single copy per cell, allowing for a better control of protein expression under the xylose promoter.^{43,44} Finally, in this study, we have shown that the introduction of a TAP coding DNA into *Xac* had no detectable effect on virulence, which emphasizes and underlines the utility of the TAP-expression vectors for protein interaction studies in this plant pathogen.

Result obtained from this study proved that the TAP-tag could be stably expressed and purified from the soluble phase of Xac cell extracts. Currently, we are in the process of testing a number of TAP-protein fusions (hypothetical, previously characterized and control factors) in our model organism in an attempt to conduct functional assignments using the TAP-tagging strategy. Apart from its use in TAP-tagging experiments, the expression vectors pHF5Ca and pHF5Na can also be applied for protein expression and purification from *Xanthomonas* spp. thus eliminating the need for heterologous expression in *E. coli*. An example of this application is the strategy for expression and purification of TAP1479 outlined above. Another feasible application would be in genetic complementation tests *in vivo*. In such experiments, the TAP coding DNA may be removed during the cloning steps such that the polypeptide produced in Xac will not carry any tag.

Although extensively explored in eukaryotes, the utility of tandem affinity purification for protein-protein interaction analysis in prokaryotes is limited.^{24,26,45-49} TAP-tagging was originally used in *E. coli* as a tool for exploring the biological roles of components of protein complexes involving ACP and other cellular factors, as well as for the characterization of YdbB (EntH), a thioesterase produced in *E. coli* under iron starvation.^{26,45,47,48} A broader high-throughput protein interaction study using TAP-tag has been reported in *E. coli* in which 857 proteins were tagged²⁴; more than six hundred proteins were successfully purified; of which, 530 were found to be a part of protein-protein complexes. Protein interactants were subsequently identified by mass spectrometry and the resultant data were compiled to build a network of protein-protein associations covering a vast variety of biological activities. Additionally, the network raised the possibility of annotating uncharacterized factors with their designated function. More recently, TAP-tagging has been used to label factors in *X. oryzae* pv. *oryzae*^{34,35} allowing for the quantitative analyses of protein expression and secretion. TAP-labeling was also used by our group, in a previous study, to detect the expression of the chromosome segregation protein ParB in Xac.⁴⁰ In conclusion, the results outlined above have demonstrated the stability of the TAP moiety and the expression vectors described herein have the potential to develop into valuable tools for exploring protein networks in Xac especially where factors of unknown function may be participants.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

GCD and PMMM received scholarships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/19806-5 and 2006/59494-9) and CAPES/Brazil. This work was funded by FAPESP grant numbers 2004/09173-6, and 2013/50367-8.

REFERENCES

- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*. 2002;417:459-463.
- Alegria MC, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS. 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*. 2004;186:6186-6197.
- Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, et al. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J Bacteriol*. 2005;187:2315-2325.
- Cernadas RA, Camillo LR, Benedetti CE. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii. *Mol Plant Pathol*. 2008;9:609-631.
- Galvao-Botton LM, Katsuyama AM, Guzzo CR, Almeida FC, Farah CS, Valente AP. High-throughput screening of structural proteomics targets using NMR. *FEBS Lett*. 2003;552:207-213.
- Jungblut PR, Bumann D, Haas G, et al. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*. 2000;36:710-725.
- Shin NR, Lee DY, Yoo HS. Identification of quorum sensing-related regulons in *Vibrio vulnificus* by two-dimensional gel electrophoresis and differentially displayed reverse transcriptase PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;50:94-103.
- Stelzer S, Egan S, Larsen MR, Bartlett DH, Kjelleberg S. Unravelling the role of the ToxR-like transcriptional regulator WmpR in the marine antifouling bacterium *Pseudalteromonas tunicata*. *Microbiology*. 2006;152:1385-1394.
- Wang J, Ying T, Wang H, et al. 2-D reference map of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R proteins. *Proteomics*. 2005;5:4488-4495.
- Goncalves ER, Hara H, Miyazawa D, Davies JE, Eltis LD, Mohn WW. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:6183-6193.
- He YW, Xu M, Lin K, et al. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol*. 2006;59:610-622.
- de Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, et al. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact*. 2003;16:867-875.
- Qiao J, Huang S, Te R, Wang J, Chen L, Zhang W. Integrated proteomic and transcriptomic analysis reveals novel genes and regulatory mechanisms involved in salt stress responses in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:8253-8264.
- Qiao J, Shao M, Chen L, et al. Systematic characterization of hypothetical proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals proteins functionally relevant to stress responses. *Gene*. 2013;512:6-15.
- Kumar A, Bimolata W, Kannan M, Kirti PB, Qureshi IA, Ghazi IA. Comparative proteomics reveals differential induction of both biotic and abiotic stress response associated proteins in rice during *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. *Funct Integr Genom*. 2015;15:425-437.
- Meile JC, Wu LJ, Ehrlich SD, Errington J, Noirot P. Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent

- protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. *Proteomics*. 2006;6:2135–2146.
17. Martins PM, Lau IF, Bacci M, et al. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;2010:23.
 18. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*. 1989;340:245–246.
 19. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5752–5756.
 20. Rain JC, Selig L, De Reuse H, et al. The protein–protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2001;409:211–215.
 21. Puig O, Caspari F, Rigaut G, et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification: a generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Methods*. 2001;24:218–229.
 22. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 1999;17:1030–1032.
 23. Burckstummer T, Bennett KL, Preradovic A, et al. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods*. 2006;3:1013–1019.
 24. Butland G, Peregrin-Alvarez JM, Li J, et al. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature*. 2005;433:531–537.
 25. Dawson SC, Pham JK, House SA, Slawson EE, Cronenbold D, Cande WZ. Stable transformation of an episomal protein-tagging shuttle vector in the piscine diplomonad *Spironucleus vortens*. *BMC Microbiol*. 2008;8:71.
 26. Gully D, Moinier D, Loiseau L, Bouveret E. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett*. 2003;548:90–96.
 27. Kamil JP, Coen DM. Human cytomegalovirus protein kinase UL97 forms a complex with the tegument phosphoprotein pp65. *J Virol*. 2007;81:10659–10668.
 28. Mayer D, Baginsky S, Schwemmle M. Isolation of viral ribonucleoprotein complexes from infected cells by tandem affinity purification. *Proteomics*. 2005;5:4483–4487.
 29. Meima ME, Weening KE, Schaap P. Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in *Dictyostelium*. *Protein Expr Purif*. 2007;53:283–288.
 30. Nakagawa T, Kurose T, Hino T, et al. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*. 2007;104:34–41.
 31. Rohila JS, Chen M, Cerny R, Fromm ME. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J*. 2004;38:172–181.
 32. Van Leene J, Witters E, Inze D, De Jaeger G. Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci*. 2008;13:517–520.
 33. Zhou D, Ren JX, Ryan TM, Higgins NP, Townes TM. Rapid tagging of endogenous mouse genes by recombineering and ES cell complementation of tetraploid blastocysts. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:e128.
 34. Kim S, Nguyen TD, Lee J, et al. Homologous expression and T3SS-dependent secretion of TAP-tagged Xo2276 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* induced by rice leaf extract and its direct in vitro recognition of putative target DNA sequence. *J Microbiol Biotechnol*. 2013;23:22–28.
 35. Kim SH, Lee SE, Hong MK, et al. Homologous expression and quantitative analysis of T3SS-dependent secretion of TAP-tagged XoAvrBs2 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* induced by rice leaf extract. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;21:679–685.
 36. Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol*. 2006;29:690–695.
 37. Schaad NW, Postnikova E, Lacy GH, et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2005;28:494–518.
 38. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
 39. Ferreira H, Barrientos FJA, Baldini RL, Rosato YB. Electrotransformation in three pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1995;43:651–655.
 40. Ucci AP, Martins PM, Lau IF, Bacci M Jr, Belasque J Jr, Ferreira H. Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *MicrobiologyOpen*. 2014;3:29–41.
 41. Rocha EP, Danchin A, Viari A. Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:3567–3576.
 42. Weser S, Gerlach M, Kwak DM, Czerwinska M, Godecke A. Detection of TAP-tagged proteins in Western blot, confocal laser scanning microscopy and FACS using the ZZ-domain. *J Biochem Biophys Methods*. 2006;68:189–194. Epub 2006 June 15.
 43. Gueiros-Filho FJ, Losick R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev*. 2002;16:2544–2556.
 44. Lewis PJ, Marston AL. GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1999;227:101–110.
 45. Battesti A, Bouveret E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol*. 2006;62:1048–1063.
 46. Battesti A, Bouveret E. Improvement of bacterial two-hybrid vectors for detection of fusion proteins and transfer to pBAD-tandem affinity purification, calmodulin binding peptide, or 6-histidine tag vectors. *Proteomics*. 2008;8:4768–4771.
 47. Gully D, Bouveret E. A protein network for phospholipid synthesis uncovered by a variant of the tandem affinity purification method in *Escherichia coli*. *Proteomics*. 2006;6:282–293.
 48. Leduc D, Battesti A, Bouveret E. The hotdog thioesterase EntH (YbdB) plays a role in vivo in optimal enterobactin biosynthesis by interacting with the ArCP domain of EntB. *J Bacteriol*. 2007;189:7112–7126.
 49. Zeghouf M, Li J, Butland G, et al. Sequential Peptide Affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *J Proteome Res*. 2004;3:463–468.

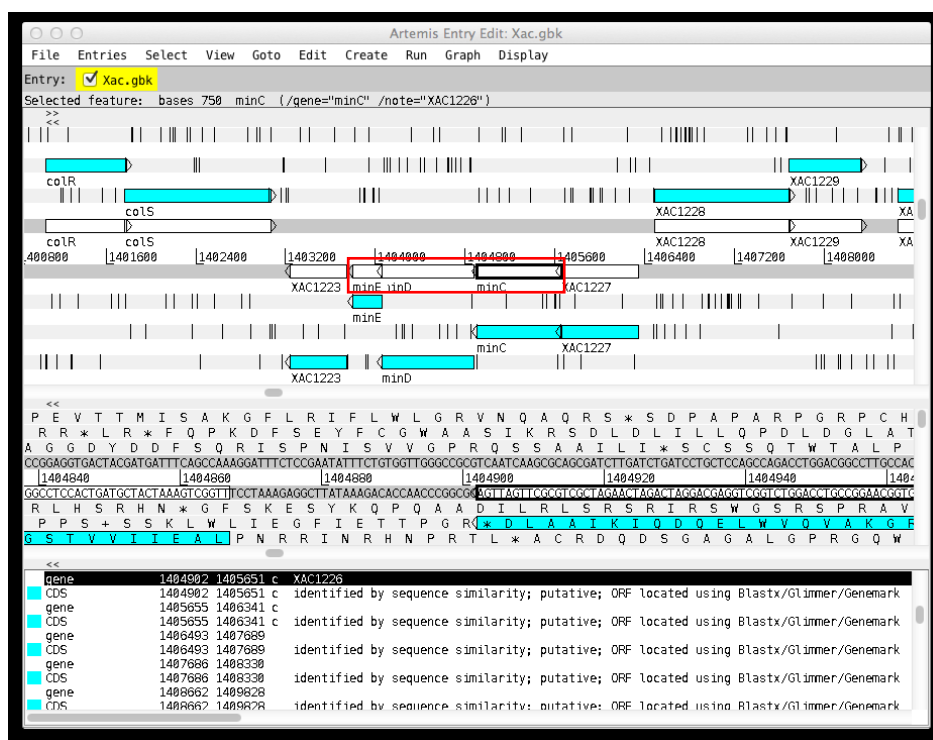
CAPÍTULO 4

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Atividade de *minCDE* em Xac

No genoma anotado de Xac [Fig.7 e (da Silva *et al.*, 2002)] foram identificadas três ORFs, XAC1224, XAC1225 e XAC1226, organizadas em um único operon, que apresentaram homologias com os genes *minE*, *minD* e *minC*, respectivamente, de *E. coli*. Os produtos destes genes em *E. coli* (MinCDE), e de outras bactérias, compõem um sistema de organização tempo-espacial celular e que operam na seleção de sítio para montagem do septo divisional de FtsZ (Lutkenhaus, 2007). Entretanto, este sistema encontra-se ausente em bactérias como *C. crescentus*, onde em seu lugar, há o uso de um sistema ParB-MipZ igualmente capaz de direcionar a formação do septo composto por FtsZ no centro das células em divisão (Thanbichler & Shapiro, 2006). Levando em conta que Xac e *C. crescentus* possuem uma certa semelhança de como segregam seus cromossomos (Ucci *et al.*, 2014), a XAC também possui homólogos de *minCDE*.

Figura 7. Operon *minCDE* em Xac.



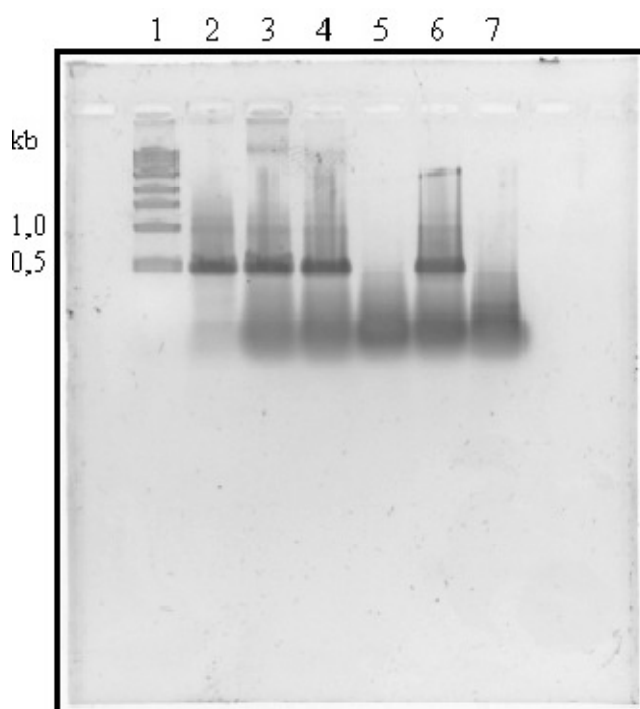
Visão geral das ORFs XAC1224, 1225 e 1226, que apresentam homologia com os genes *minE*, *minD* e *minC* de *E. coli*, respectivamente. Gráfico gerado com programa Artemis 13.0 (Sanger).

A investigação foi iniciada estudando a atividade do proposto operon *minCDE* de Xac por RT-PCR. Xac foi cultivada em condições padrão até $aDO_{600nm} \sim 1$ (midi-log; Sumares et al., 2015), quando foi extraído RNA total e feita a conversão da primeira fita de cDNA usando paratal um primer que se anela na porção 3' da ORF XAC1225 (*minD*), *minDKO* R(reverse), apontando para XAC1226 (*minC*) (Figura7). Em seguida à conversão da primeira fita de cDNA, o material foi amplificado utilizando o par de primers *minDKO* F (forward)/R (reverse) que faria a seleção de XAC1225 (Figura8). Mostrada a funcionalidade do par de primers *minDKO* F/R com a amplificação por Taq DNA polimerase do produto de ~500pb referente à uma porção interna da ORF XAC1225; o molde utilizado foi o DNA genômico extraído de Xac (Figura8, canaleta 3). As canaletas 4 e 5, mostram a eficiência do tratamento com DNaseI para remoção de traços de DNA genômico do extrato de RNA total (que foi utilizado na reação de

conversão da primeira fita de cDNA). Note que na canaleta 4, houve amplificação de XAC1225 em PCR com Taq DNA polimerase antes do tratamento com DNaseI, enquanto que não foi detectada nenhuma amplificação após tratamento com esta nuclease (canaleta 5). Finalmente, foi observada a amplificação de XAC1225 em PCR com Taq DNA polimerase e primers minDKO F/R a partir do cDNA derivado da transcrição reversa com minDKO R e o extrato de RNA total tratado com DNaseI (canaleta 6). Adicionalmente, foi detectado o produto referente a XAC1226 em PCR para tal usando como molde o mesmo cDNA obtido da transcrição reversa com minDKO R (dados não mostrados). Desta forma, no extrato de RNA total haviam RNAs para XAC1225 e XAC1226, e que a obtenção do produto referente a XAC1226 nas análises de RT-PCR comprova a expressão destas ORFs na forma de mRNA policistrônico a partir de um promotor a 5' de XAC1226. Fica evidente que o operon “minCDE” de Xac é ativo.

Para facilitar a referência a outros sistemas bacterianos operando na mesma função de seleção de sítio de divisão, daqui em diante XAC1224, XAC1225 e XAC1226 serão referidas, respectivamente, como *minE*, *minD* e *minC*.

Figura 8. Atividade do operon *minCDE* em Xac.



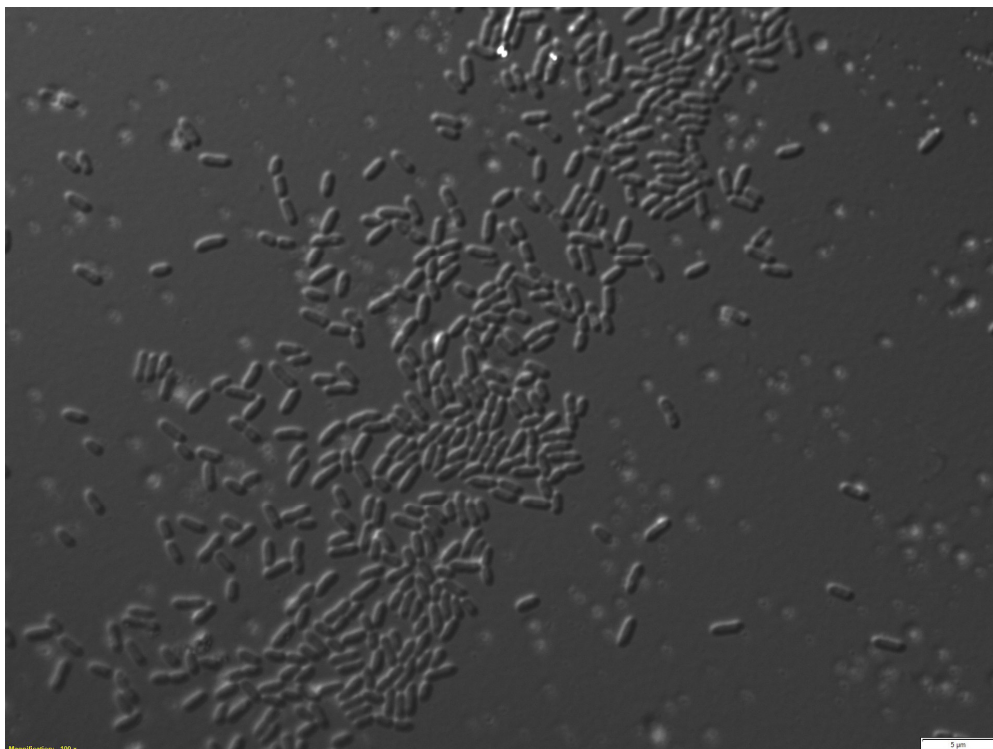
Gel de agarose com os produtos das reações de RT-PCR para investigar a atividade do operon *minCDE* de Xac. Canaletas: 1) ladder, 2) controle do kit de RT-PCR, 3) minD utilizando como molde DNA cromossômico de Xac, 4) minD utilizando como molde extrato de RNA total de Xac (não tratado com DNaseI), 5) reação para amplificação de minD utilizando a enzima Taq e o extrato de RNA total de Xac após tratamento com DNaseI, 6) minD utilizando como molde o cDNA produzido a partir do extrato de RNA total de Xac após tratamento com DNaseI e 7) controle negativo sem ácido nucleico.

6.2 Deleção de *minC* em Xac promove erros de divisão celular

Para avaliarmos o efeito da deleção de *minC* em Xac cultivamos as células por um período de 14h, foram diluídas na mesma condição para a $DO_{600nm} \sim 0,1$ e ao atingirem a $DO_{600nm} \sim 0,3$ foram observadas ao microscópio. Adicionamos arabinose no cultivo para indução do promotor para observarmos o efeito de MinC na morfologia de Xac. Entretanto, em nenhuma das tentativas o êxito foi obtido em se detectar variações morfológicas típicas da perturbação do sistema MinCDE: produção de filamentos pela inibição de septação adequada nas células, montagem de septo em locais diferentes do centro dos bastonetes (perda de controle espacial na septação) e

formação de minicélulas (Raskin & de Boer, 1997; Raskin & de Boer, 1999a; Raskin & de Boer, 1999b; Lutkenhaus, 2007). Independente da condição testada, a morfologia do mutante *XacΔminC/pGCD1c* mut 24 foi sempre semelhante à morfologia da linhagem selvagem (Figura 9).

Figura 9. Microscopia de *XacΔminC/pGCD1c*.



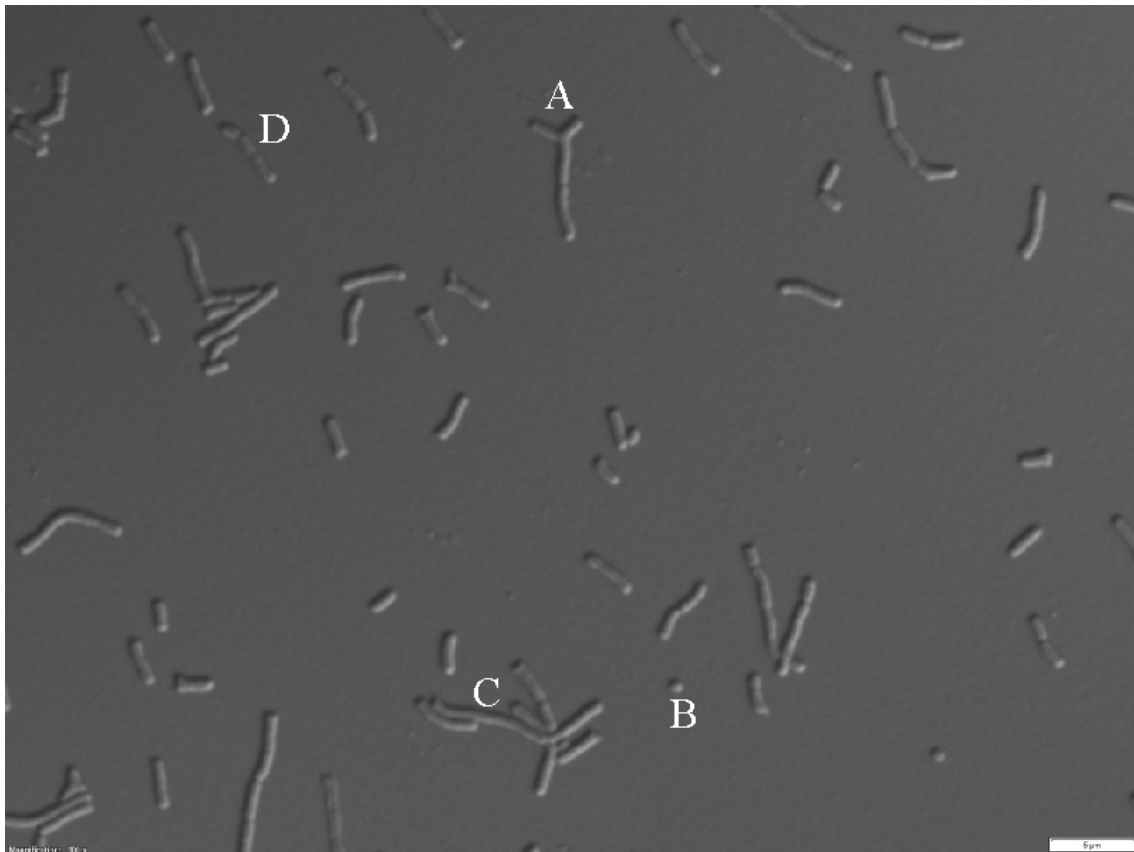
Células foram cultivadas em meio mínimo acrescido de glicerol e gentamicina (marca do vetor de complementação replicativo pGCD1c) por 14h a 30°C e 200rpm; a seguir células foram diluídas para a $DO_{600nm} \sim 0,1$ nas mesmas condições e por fim, foram observadas em DIC ao atingirem a $DO_{600nm} \sim 0,3$.

Dentre as possíveis explicações para tal observação citamos: o mutante *minC* (mut 24) está adequadamente complementado pelo vetor pGCD1c, mas o tratamento com glicose não está sendo eficaz para a depleção de MinC. Para investigar isto, submetemos o mut 24 a crescimento mais longo em meio mínimo com substituições de meio a cada 12-14h. O motivo para tal deriva da observação de que nos testes de

depleção de ParB-TAP (Lacerda, 2015), uma eficiente eliminação da proteína só foi obtida após 12h de crescimento na presença do repressor glicose. Considera-se, claro, que ParB é uma proteína estável durante o ciclo celular (Glaser, et al., 1997), e que o tempo de remoção desta pode diferir consideravelmente do tempo para remoção de MinC. Porém, adotando como parâmetro o observado para ParB-TAP, *XacΔminC/pGCD1c* mut 24 foi cultivado em meio mínimo com ou sem glicose com trocas de meio e diluição da cultura em tempos definidos (a cada 12-14h) em uma tentativa para se esgotar MinC (Figura 9).

Observou-se finalmente o aparecimento de variantes morfológicas que sugerem alteração em divisão celular (Figura 10, A-D). Nota-se o aparecimento de minicélulas (B), filamentos (C) e formação de septos em regiões não exatamente no centro de bastonetes (D), além de ramificações (A). Todos estes fenótipos sugerem erros de divisão já bem documentados na literatura [revisto por (Lutkenhaus, 2007)]. Na ausência de MinC ou da função do sistema MinCDE, o septo pode não se formar produtivamente em um único sítio promovendo filamentação ou poderia ainda se formar em locais inapropriados como nas proximidades dos polos levando a formação de minicélulas. Todas estas estruturas foram observadas para nosso mutante *XacΔminC/pGCD1c* (Figura 10).

Figura 10. Micrografia de Xac $\Delta minC$ /pGCD1c em DIC.

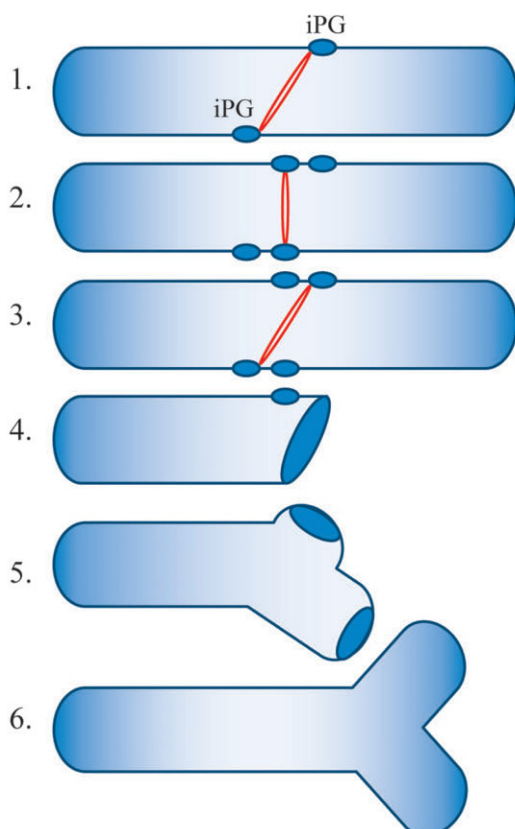


Células crescidas em meio mínimo com 2% glicerol por 36h a 30°C e 200rpm e com meio trocado em 12-14h e a cada troca foi diluída as células para a $DO_{600nm} \sim 0,1$. A) ramificação; B) minicélula; C) espichamento; D) septo mal posicionado.

Um novo fenótipo foi presenciado em *Xac* $\Delta minC$ /pGCD1c, as ramificações (Figura 10A). A formação deste tipo celular tem sido estudada e aparenta dar-se pelo posicionamento inadequado do anel de FtsZ em células com alteração de sistemas que controlam a montagem do septo (Potluri, et al., 2012). Potluri et al. (2012) sugerem um modelo para explicar a formação das ramificações, onde em um dado momento do ciclo, e em uma célula em divisão, fatores com função de deposição de peptidoglicanos (PG) podem ser mal posicionados por erros de posicionamento do anel de FtsZ. Previamente à divisão, o anel Z pode ser reposicionado e aqueles fatores continuarão onde foram localizados anteriormente; mediante divisão, tais fatores podem levar à

deposições de PG e extrusão de ramos (vide Figura 11). Tal constatação corrobora a alteração de *minC* em Xac e a disrupção do sistema de posicionamento do septo.

Figura 11. Modelo para formação de ramificações celulares por deficiência de formação de septo divisional.

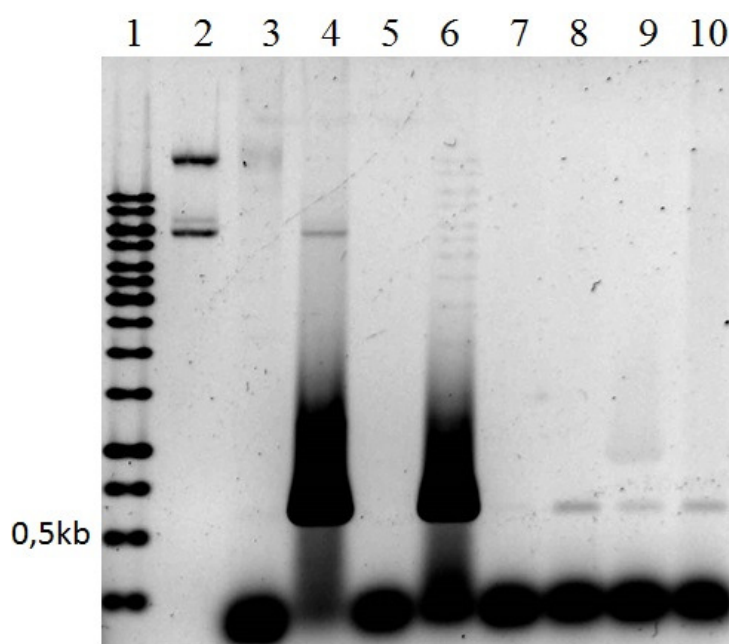


Extraído de (Potluri, et al., 2012): Mecanismo de ramificação celular. (1) Na ausência de PBP5, podem formar no centro da célula anéis de FtsZ inclinados iniciando a síntese de peptidoglicano inerte (iPG) (ovóides azul). (2) Antes do início da invaginação, o anel Z pode ser reorientado e iniciar a síntese de iPG em locais diferentes do primeiro. (3) Um anel Z inclinado inicia a invaginação. (4) As células filhas têm um polo consistindo de iPG e pelo mesmo mais um outro ponto de iPG um pouco distante. (5) Durante o crescimento celular, são inseridos peptidoglicano na parede celular nos pontos de iPG. (6) A parede celular alonga-se no ponto de iPG e cria um ramo e um polo ectópico.

Durante o experimento de depleção descrito na Figura 10, fizemos o crescimento da cultura na ausência de gentamicina, marca do vetor de complementação pGCD1c, para uma otimização do meio mínimo. Durante um mês este mesmo procedimento foi

repetido exaustivamente com a adição de gentamicina ao inóculo mas todos os teste foram sem sucesso. Só então repetiu-se o teste nas mesma condições que o mesmo experimento, ou seja, sem a marca de seleção e só assim foi possível o isolamento de um novo variante do mutante 24 que recebeu o nome de variante 71. Esta nova célula conseguiu expulsar o pGCD1c e assim curando-se. O variante 71 (var71) não possui mais *minC* cromossômico e nem o *minC* em trans provido do pGCD1c como pode ser visto na figura 12 por um PCR diagnóstico para o *genegentamicina* presente no pGCD1c.

Figura 12. PCR diagnóstico do *genegentamicina*.



Gel de agarose mostrando produtos de PCR diagnóstico para gentamicina. Canaleta: 1) marcador de peso molecular, 2)pGCD1c, 3) Xac WT, 4 e 6) mutante 24, 5) branco, 7-10) Xac $\Delta minC$ (variantes 17, 41, 71 e 84, respectivamente).

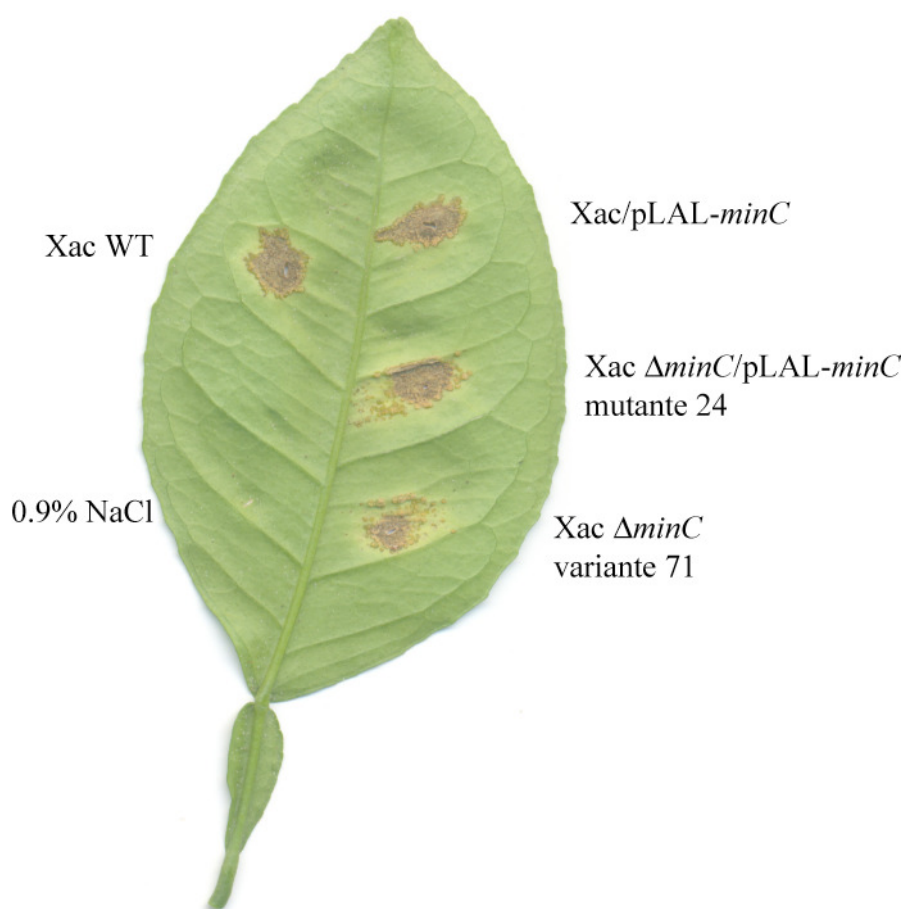
6.3 Mutantes de Xac retém habilidade de colonizar hospedeiro citros

O trabalho de Silva et al., (2013) demonstrou que perturbações dos processos de divisão celular e Ucci et al., (2014) com perturbação na segregação cromossômica ambos em Xac podem promover perda de virulência/patogenicidade. Para averiguar se os mutantes *minC* selecionados (mut24 e var71) retêm patogenicidade, estes foram inoculados em folhas de laranja doce cultivar “Pera” (hospedeiro susceptível) (Figura 13). A linhagem selvagem, Xac WT, quanto a linhagem selvagem portando o vetor de complementação pLAL-*minC*, Xac/pLAL-*minC*, foram capazes de induzir sintomas típicos de cancro cítrico caracterizados por lesões corticosas eruptivas, apresentando, por vezes, halos amarelados em sinal de clorose. Nenhum sintoma foi observado na área infiltrada pelo veículo salina (NaCl 0,9%). A diferença entre estas duas linhagens é que Xac/pLAL-*minC* expressa cópias extras de MinC e que poderia já apresentar erros de divisão dependendo da dose de MinC produzida dentro das células (caráter de expressão de cópias extras de MinC). Como visto aqui, a linhagem com cópias extras de MinC (mut24) não apresentou alteração de virulência. A mesma capacidade de indução de sintomas foi observada para as linhagens de Xac portando deleção do gene *minC* (var71). Nestas, tanto o mutante complementado Xac $\Delta minC$ /pLAL-*minC* quanto o mutante limpo Xac $\Delta minC$ foram tão capazes de induzir cancro cítrico quanto a linhagem selvagem. Em inspeção visual e com relação ao tempo de aparecimento das lesões não foi possível diferenciar mutante de deleção *minC* do isolado selvagem.

A deleção de genes *min* tem sido relacionada com perda de virulência em *Neisseria gonorrhoeae*, *Aeromonas hydrophila* e *E. coli* (Parti, et al., 2011a; Parti, et al., 2011b; Parti, et al., 2013; Huang, et al., 2015), onde tais relatos impulsionaram nossa busca por indícios de alteração de fenótipo de patogenicidade em Xac $\Delta minC$. Em *Neisseria*, mutação de *minD* promoveu ainda alterações morfológicas, citocinese

aberrante e formação defectiva de microcolônias (Parti, et al., 2013). Curiosamente, em *Neisseria*, os genes *minCDE* são co-transcritos com *oxyR*, que por sua vez codifica um regulador transcricional responsivo a estresse oxidativo. Mutação de *oxyR* somente produziu fenótipos típicos de mutantes *min*, incluindo divisão celular alterada e erros de segregação cromossômica. Além disto, OxyR parece envolvido na regulação do operon *minCDE* nesta bactéria. Já em *E. coli*, mutação em *minD* alterou aderência celular necessária para a virulência bacteriana (Parti, et al., 2011a). Autores especulam que esta perda de virulência possa estar relacionada à alterações morfológicas dos mutantes. Finalmente, estes relatos demonstram a possibilidade de ligação direta, ou indireta, entre *min* e patogenicidade.

Figura 13. Indução do sintoma de cancro cítrico em laranja pera.



Avaliação da capacidade de produção de doença por mutantes *minC* em Xac. A Linhagem selvagem de Xac e mutantes para *minC* foram inoculados no hospedeiro susceptível (laranja Pera) por infiltração. Sintomas foram documentados 30 dias pós-inoculação. Vista da superfície abaxial: Xac WT, linhagem selvagem; 0,9% NaCl, veículo utilizado para diluição das culturas celulares para 10^6 CFU/mL; Xac/pLAL-*minC*, Xac WT portando vetor replicativo de complementação expressando MinC a partir do promotor arabinose; Xac Δ *minC*/pLAL-*minC*, mutante de deleção *minC* complementado; Xac Δ *minC*, variante 71 não complementado.

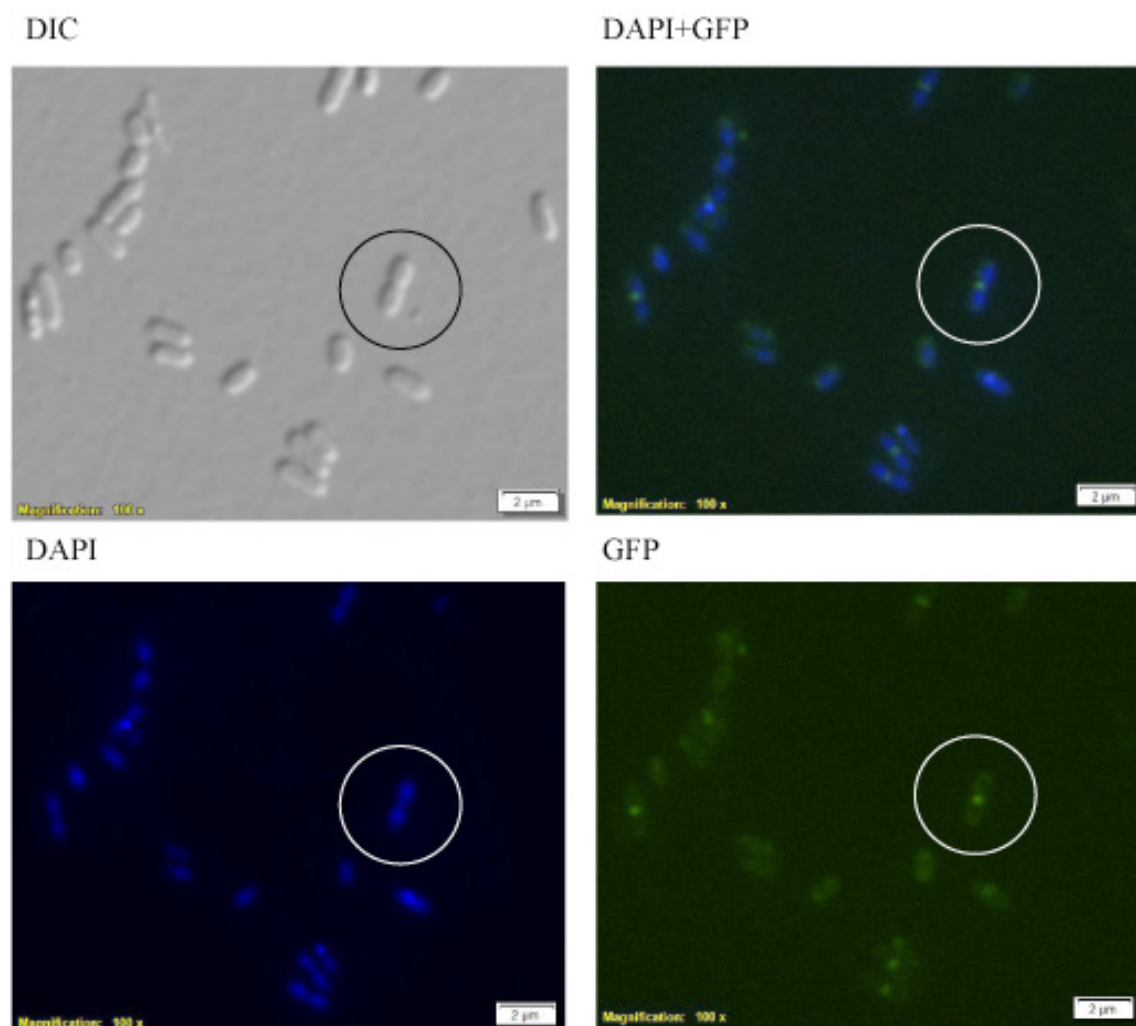
6.40 gene *minC* é requerido para uma septação normal em Xac

Em *E. coli* mostrou-se que a deleção de gene codificando para proteína ligante a penicilina de baixo peso molecular (*pbp5*) promove septação alterada e esta seria uma explicação para o fenótipo de ramificação observado no mutante *pbp5* (Potluri, et al., 2012). Com o intuito de investigar se o mutante Xac Δ *minC* apresentaria formação anormal de septo divisional semelhante a *E. coli* *pbp5*, a linhagem var71 (Xac Δ *minC*) foi transformada com vetor para expressão de GFP-ZapA. A expressão de GFP-ZapA no var71 promoveria a marcação do septo divisional e possibilitaria o estudo da sua morfologia. Como controle, comparamos a septação na linhagem de Xac expressando GFP-ZapA [Xac amy::pPM2a-zapA (Martins, et al., 2010)] (Figura 14). Nesta linhagem o septo encontra-se em geral corretamente posicionado entre dois bastonetes em estágio avançado de divisão (círculos na figura; veja septo em GFP e DAPI+GFP). Note ainda que o septo (barra verde) encontra-se perfeitamente perpendicular ao eixo longitudinal da célula, o que é considerado uma morfologia padrão. Finalmente, vemos um nucleóide bem distribuído, evidenciando correta segregação do material genético para células filhas (painel DAPI e DAPI+GFP).

Contrariamente ao observado para Xac amy::pPM2a-zapA, vemos que o var71 expressando GFP-ZapA apresenta septo, quando visível, não perfeitamente perpendicular ao eixo maior do bastonete (Figura 15, setas). Notamos ainda que a distribuição e organização do nucleóide está comprometida (DAPI). Em 3C-meio NYG,

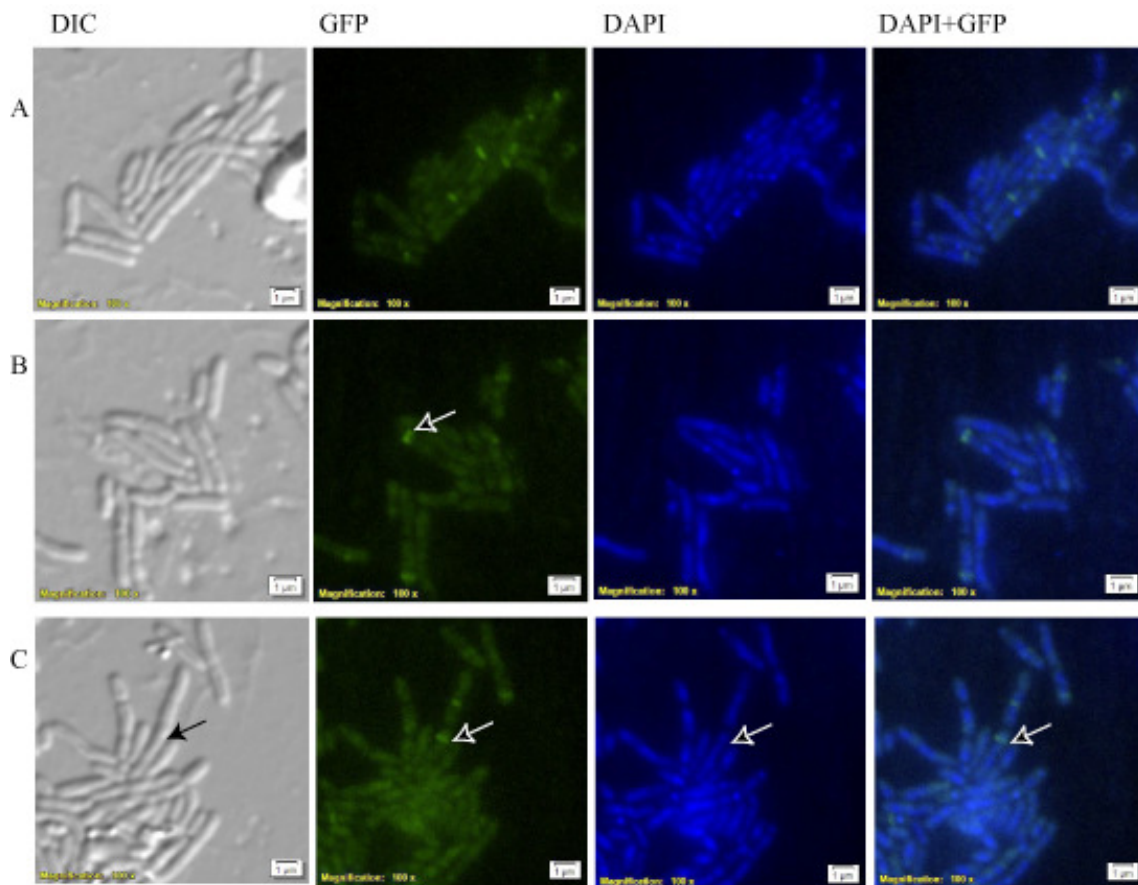
vemos que a massa cromossômica parece mal distribuída, o que seria esperado em um filamento incapaz de se dividir corretamente. Curiosamente, a mesma linhagem crescida em meio mínimo, onde em geral o crescimento é mais lento, mostra uma melhor distribuição/segregação da massa cromossômica ao longo dos filamentos (Figura 15AB-meio mínimo). Entretanto, vemos que a septação é anormal e, quando ocorre, a estrutura do septo não segue um correto posicionamento; tal observação parece semelhante ao fenótipo defeutivo relatado para *E. coli* *pbp5* (Potluri, et al., 2012).

Figura 14. Visualização do septo divisional em Xac.

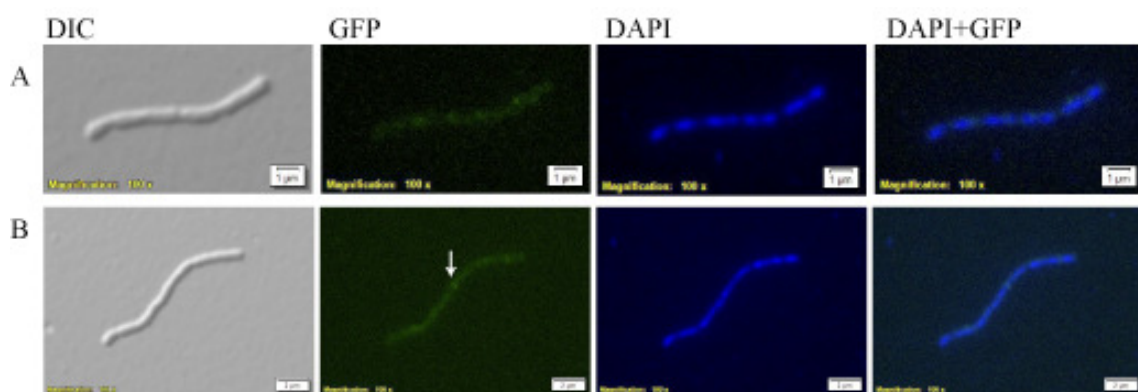


A Linhagem de Xac, expressando GFP-ZapA (*Xac amy::pPM2a-zapA*), foi cultivada em meio mínimo acrescido de glicerol 2% e observada por microscopia de fluorescência na D.O.600nm ~0,4. DIC, differential interference contrast; DAPI, corante para nucleóide. Aumento de 100X; barra 2 μM.

Figura 15. Visualização do septo divisional na linhagem var71 expressando GFP-ZapA.



var71 GFP-ZapA - meio rico NYG



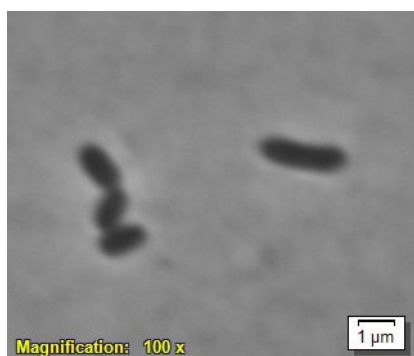
var71 GFP-ZapA - meio mínimo

Var71, expressando GFP-ZapA (*Xac ΔminC amy::pPM2a-zapA*), foi cultivada em meio mínimo acrescido de glicerol 2% e observada por microscopia de fluorescência na D.O.600nm ~0,4. DIC, (differential interference contrast); DAPI, corante para DNA. Aumento de 100X; barra 1 µM.

6.5 *Xac* Δ *minC* pode ser complementado com GFP-MinC

Para ampliarmos nossa avaliação da funcionalidade de MinC em *Xac*, transformamos o mutante de deleção, *var71*, com vetor capaz de expressar GFP-MinC a partir de sítio ectópico. Primeiramente, averiguamos a morfologia deste em meio mínimo por microscopia de contraste diferencial (Figura 16). Observamos que o mutante apresentava caráter complementado onde os fenótipos de filamentação, formação de minicélulas e ramificação haviam desaparecido. O mutante apresentou morfologia semelhante à linhagem selvagem (compare imagens da Figura 14 e 16) indicando que a fusão GFP-MinC pode complementar o padrão de forma de *Xac*. As observações não foram feitas sem a indução da expressão de GFP-MinC com arabinose.

Figura 16. Visualização do mutante *var71* complementado com GFP-MinC.

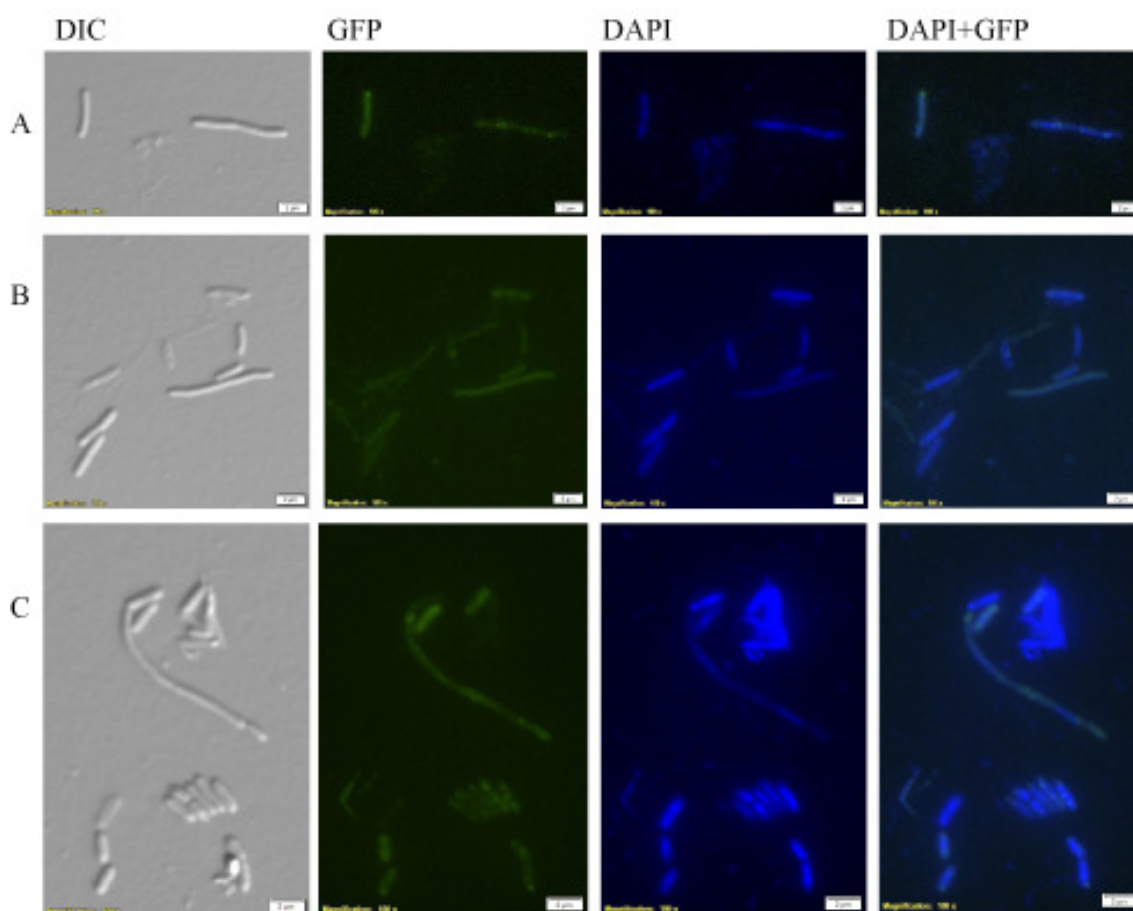


Var71, expressando GFP-MinC (*Xac* Δ *minC* *amy*::pGCD2c), foi cultivado em meio mínimo acrescido de glicerol 2% e observado por microscopia de contraste diferencial (DIC) na D.O.600nm ~0,4. Aumento de 100X; barra 1 μ M.

Na sequência, avaliamos a expressão de GFP-MinC na linhagem selvagem (Figura 17). Vemos aqui que a simples presença do vetor de expressão na forma de cópia simples integrado no locus *amy* foi suficiente para induzir filamentação e erros de divisão/segregação na bactéria. Note que não induzimos o promotor arabinose antes da

observação, e que a produção do fenótipo alterado indica, provavelmente, vazamento do mesmo em nossas condições experimentais.

Figura 17. Visualização de Xac selvagem expressando cópias extras de MinC na forma de GFP-MinC.

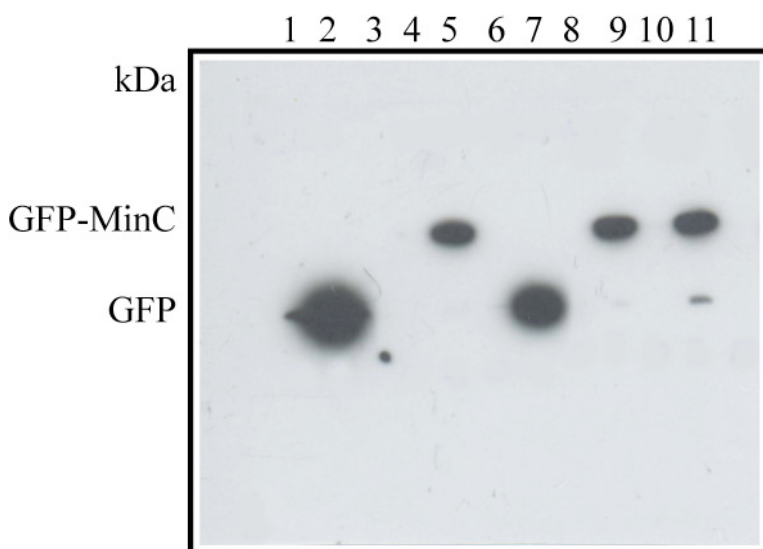


Xac, expressando GFP-MinC (Xac *amy::pGCD2c*), foi cultivada em meio mínimo acrescido de glicerol 2% e observada por microscopia de contraste diferencial (DIC) e fluorescência (GFP e DAPI) na D.O.600nm ~0,4. DIC, differential interference contrast; GFP, marca de GFP-MinC; DAPI, corante para DNA. Aumento de 100X; barra 1 µM.

Com o intuito de estudarmos a expressão de GFP-MinC nas linhagens selvagem e mutante *minC*, var71, procedemos à detecção da fusão GFP-MinC em *Western blot* (Figura 18). Como controles para imunodeteção de GFP usamos Xac selvagem e var71 transformados com vetor vazio pGCD21 (permite a expressão de GFP somente). Note

que ambos levaram a produção de sinal em *Western* compatível com o tamanho esperado de GFP (Figura 16, canaletas 1-2 e 6-7). Nas análises realizadas foi possível detectar vazamento do promotor arabinose tanto em Xac *amy::pGCD21* quanto no mutante Var 71 *amy::pGCD21* (canaletas 1 e 6), mediante produção de sinal extremamente fraco na posição esperada para GFP. Embora ocorra vazamentos, foi visto que são mínimos, de difícil percepção em *Western* nas condições testadas. Além disto, foi constatada a funcionalidade e utilidade deste promotor em Xac (integrado no cromossomo bacteriano), e mostrado aqui que a repressão com glicose por 16h leva a uma expressão quase imperceptível em *Western*. Quando avaliada a expressão da fusão GFP-MinC em Xac e var 71 transformados com o vetor integrativo pGCD2c, foi vista a produção de sinal compatível com esta fusão nas canaletas 5, 9 e 11. Notou-se que praticamente não foi possível detectar a fusão sem indução com arabinose (canaletas 4, 8 e 10). Aqui foram avaliados dois mutantes de integração de pGCD2c no locus *amy* de var 71, onde ambos mostraram o mesmo padrão (canaletas 9 e 11). Tais resultados demonstram a produção estável de GFP-MinC a partir de pGCD2c em Xac e var 71, e mostra a responsividade do promotor arabinose nesta bactéria. Embora não tenha sido detectado vazamento a partir de pGCD2c em Xac e var 71 por imunodeteção (Figura 6), entendeu-se que a complementação de var 71 com tal vetor observada anteriormente pode ser fruto de vazamento mínimo, indetectável, no mutante.

Figura 18. Detecção de GFP-MinC em Xac wt e var71 por Western Blot.



Células foram cultivadas a partir da $DO_{600nm} \sim 0,1$ em meio mínimo com 2% glicerol + 2% glicose por 16h a 30°C e 200 rpm. Seguindo-se cultivo, extratos celulares foram preparados para imunodeteção utilizando-se anti-GFP policlonal produzido em coelhos. Canaletas: 1) Xac *amy::pGCD21*; 2) Xac *amy::pGCD21* 0,05% arabinose; 1h de indução 3) Marcador de peso molecular; 4) Xac *amy::pGCD2c*; 5) Xac *amy::pGCD2c* 0,05% arabinose; 6) Var 71 *amy::pGCD21*; 7) Var 71 *amy::pGCD21* 0,05% arabinose ; 8) Var 71 *amy::pGCD2c* (mutante 2); 9) Var 71 *amy::pGCD2c* (mutante 2) 0,05% arabinose; 10) Var 71 *amy::pGCD2c* (mutante 3); 11) Var 71 *amy::pGCD2c* (mutante 3) 0,05% arabinose. GFP possui um peso molecular de 27 kDa, enquanto a fusão GFP-MinC ~53 kDa.

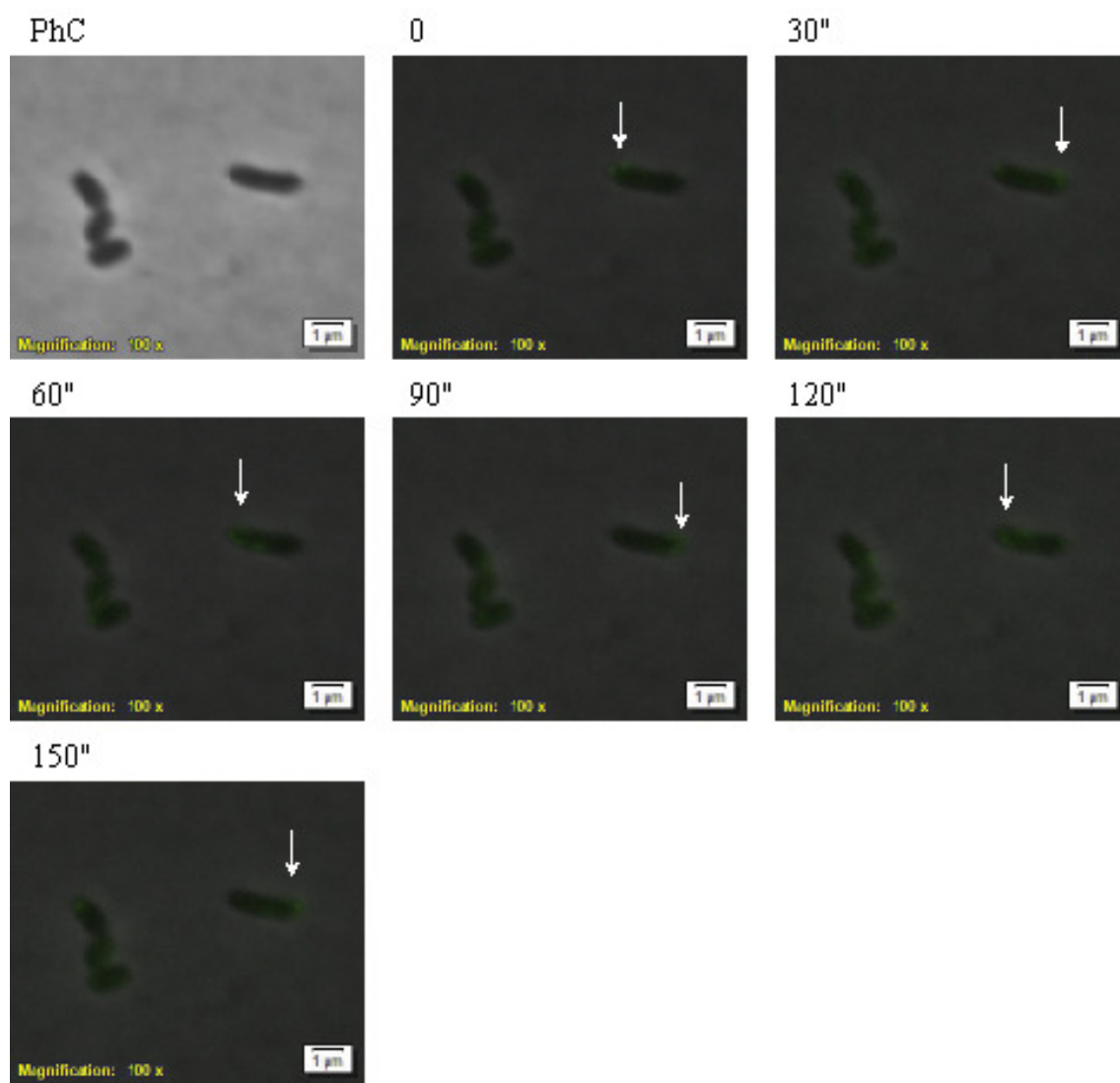
6.5 GFP-MinC apresenta localização dinâmica em Xac

Tendo constatado expressão de GFP-MinC em var 71, além de uma morfologia normal neste mutante de deleção de *minC* complementado, prosseguimos com os estudos da localização sub-celular de GFP-MinC por microscopia de fluorescência (Figura 19, A e B). Notamos que var 71 *amy::pGCD2c* apresentou sinal de fluorescência (relativo a GFP-MinC) hora acumulada em uma das extremidades do bastonete (Figura 19, A, tempo 0; seta), e em outro momento acumulada na extremidade oposta (veja tempos 30" ou 90"). No interstício destes eventos de acumulação polar, é possível notar que a fluorescência parece se dissolver ou diluir pelo citoplasma (veja tempos 60" ou 120"). Em alguns momentos do time-lapse é possível visualizar acúmulos de fluorescência em ambos os polos (Figura 19,

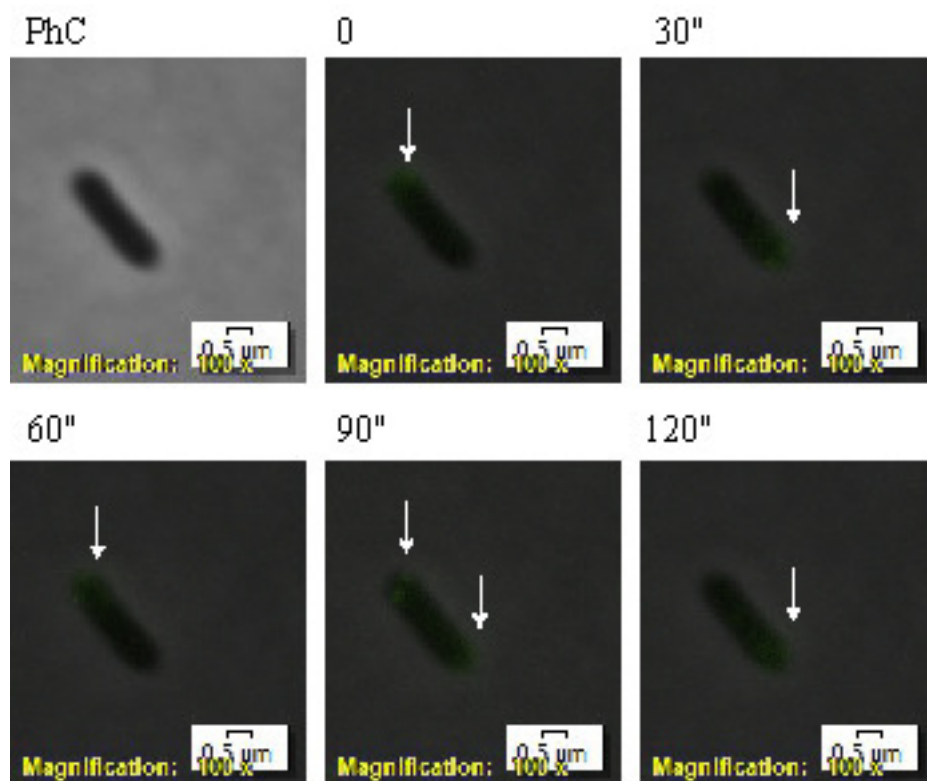
B, tempo 90”). Vemos aqui que realmente o sinal de GFP-MinC parece se acumular em um dos polos, e entre 30 a 60” mais tarde esta fluorescência é vista no polo oposto.

A localização dinâmica e oscilatória de MinC foi primeiramente relatada para *E. coli*, aliás, a única bactéria para a qual oscilação do sistema MinCDE está claramente caracterizada (Raskin & de Boer, 1999a, Raskin & de Boer, 1999b). Em *B. subtilis*, sabemos que o sistema MinCD (nesta bactéria não há um homólogo de MinE) parece estático ocupando os polos celulares e estas são recrutadas para o centro das células em divisão pelo complexo MinJ-DivIVA; entretanto, a função de inibição de septação próximo aos polos é alcançada (Marston, *et al.*, 1998, Bramkamp, *et al.*, 2008, Patrick & Kearns, 2008). Mais recentemente, sugeriu-se que o sistema MinCD em *B. subtilis* atue inibindo o reinício do divissomo. Considerando-se que DivIVA pode se mover da região polar para a septal, o sistema MinCD, atraído por DivIVA/MinJ, pode ter mobilidade (van Baarle & Bramkamp, 2010, Bach, *et al.*, 2014). Em nossas análises com Xac constatamos oscilação de GFP-MinC, dado este que sugere que o sistema MinCDE nesta bactéria seja semelhante ao sistema de *E. coli*. Até onde sabemos pela literatura, este seria o segundo relato claro de oscilação do sistema MinCDE em bactérias e o primeiro em um micro-organismo que apresenta segregação assimétrica de origens, mostrado recentemente por Ucci, *et al.*, (2014).

Figura 19. Time-lapse de var 71 expressando GFP-MinC.



A



B

Mutantes, expressando GFP-MinC (var 71 *amy::pGCD2c*), foram cultivados em meio mínimo até a D.O.600nm ~0,4, quando adicionou-se arabinose aos cultivos para 0,05% finais. A observação dos mutantes (A e B indicam observações de crescimentos diferentes do mesmo mutante) se deu a partir de 30 min após a indução e foi realizada nos tempos indicados. PhC, microscopia de contraste de fase; GFP, marca de GFP-MinC. Aumento de 100X; barra 1 ou 0,5 μm. Setas indicam concentração de sinal referente a GFP-MinC.

7. CONCLUSÃO

- Vimos que *Xanthomonas citri subsp. citri* utiliza o sistema minCDE como sistema de divisão celular;
- A ausência de MinC em Xac também apresenta os mesmo fenótipos como em *E. coli* e em *B. subtilis* com um fenótipo extra de ramificação;
- A complementação do var71 é possível quando se expressa apenas uma cópia de *minC* pois tem um melhor controle na sua dosagem do que em um sistema que expressa mais de uma cópia.
- Xac ainda continua virulenta mesmo com a falta de MinC ou com excesso dele.

REFERÊNCIAS

- Adams DW & Errington J (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol.* 7: 642-653.
- Bach JN, Albrecht N & Bramkamp M (2014) Imaging DivIVA dynamics using photo-convertible and activatable fluorophores in *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol* 5: 59.
- Barre FX, Soballe B, Michel B, Aroyo M, Robertson M & Sherratt D (2001) Circles: the replication-recombination-chromosome segregation connection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 8189-8195.
- Behlau F, Belasque JrJ, Bergamin Filho A, Leite Jr RP (2007) Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle e proteção com quebra-vento. *Fitopatologia Brasileira* 32, 311–7.
- Behlau F, Belasque JrJ, Bergamin Filho A, Graham JH, Leite JrRP, Gottwald TR (2008) Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. *Crop Protection* 27, 807–13.
- Behlau F, Belasque JrJ, Graham JH, Leite Jr RP, (2010) Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. *Crop Protection* 29, 300–5.
- Belasque Jr. J, Fernandes NG & Massari CA (2009) The Success of eradication campaign on Citrus Canker in São Paulo States, Brazil. *Summa Phytopathol* 35: 91-92.
- Belasque Jr. J, Barbosa JC, Bergamin Filho A & Massari CA (2010) Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. *Tropical Plant Pathology* 35: 314-317.
- Bernhardt TG & de Boer PA (2005) SImA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein

required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. Mol Cell. 18: 555-564.

Bitancourt AA (1957) O cancro cítrico. Biológico 23: 101-111.

Bramkamp M, Emmins R, Weston L, Donovan C, Daniel RA & Errington J (2008) A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. Mol Microbiol 70: 1556-1569.

Cha, J.-H. and G.C. Stewart. 1997. The divIVA minicell locus of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 179: 1671–1683.

Chagas MCM, Parra JRP, Namekata T, Hartung JS & Yamamoto P (2001) *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in Brazil. Neotrop. Entomol. 30: 55-59.

da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, et al. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature 417: 459-463.

Das AK (2003) Citrus canker - a review Journal of Applied Horticulture 5: 52-60.

de Boer PAJ, Crossley RE and Rothfield L. (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. Cell 56: 641±649.

de Boer PA (2010) Advances in understanding *E. coli* cell fission. Curr Opin Microbiol 13: 730-737.

Demyttenaere J, Kimpe J. Mol. Catal. B: Enzym. 11: 265, 2001.

do Amaral AM. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Comunicado Técnico-Embrapa, 86, 2003.

Durand-Heredia J, Rivkin E, Fan G, Morales J & Janakiraman A (2012) Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. J Bacteriol 194: 3189-3198.

Durand-Heredia JM, Yu HH, De Carlo S, Lesser CF & Janakiraman A (2011) Identification and Characterization of ZapC, a Stabilizer of the FtsZ Ring in *Escherichia*

coli. J Bacteriol 193: 1405-1413.

Ebersbach G, Galli E, Moller-Jensen J, Lowe J & Gerdes K (2008) Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. Mol Microbiol

68: 720-735.

Edwards, D.H. and J. Errington. 1997. The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. Mol. Microbiol. 24: 905–915.

Errington J, Daniel RA & Scheffers DJ (2003) Cytokinesis in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 67: 52-65, table of contents.

Eswaramoorthy P, Erb ML, Gregory JA, Silverman J, Pogliano K, Pogliano J e Ramamurthi KS (2011). Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. MBio 2.

FUNDECITRUS. Fundo De Defesa Da Citricultura. Disponível em:

(a) <http://fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>

(b) <http://www.fundecitrus.com.br>

(c) <http://fundecitrus.com.br/doencas/campanha.html>

Galli F. Doenças das plantas cultivadas. Manual de Fitopatologia, v. 2, p. 254-255, 1980.

Geier PW Management of insect pests. Annual Review Entomology (1966) 11:471-490.

Gerding MA, Ogata Y, Pecora ND, Niki H & de Boer PA (2007) The trans-envelope

Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. Mol Microbiol 63: 1008-1025.

Goehring NW & Beckwith J (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. Curr Biol. 15: R514-526.

Gottwald, T. R., Graham, J. H., and Schubert, T. S. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

Gueiros-Filho FJ & Losick R (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. Genes Dev. 16: 2544-2556.

Guzman LM, Belin D, Carson MJ & Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J Bacteriol 177: 4121-4130.

Guzzo CR. et al. Structure of the PilZ-FimX-c-di-GMP Complex Responsible for the Regulation of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis. Journal Molecular Biology, v. 425, n. 12, p. 2174-97, 2013.

Hale CA & de Boer PA (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. Cell. 88: 175-185.

Hale CA, Meinhardt H & de Boer PA (2001) Dynamic localization cycle of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. EMBO J 20: 1563-1572.

Hale CA, Shiomi D, Liu B, Bernhardt TG, Margolin W, Niki H & de Boer PA (2011) Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a Component of the Division Apparatus That Binds and Bundles FtsZ Polymers. J Bacteriol 193: 1393-1404.

Howard M & Kruse K (2005). Cellular organization by self-organization: mechanisms and models for Min protein dynamics. J Cell Biol 168, 533-536.

Hu Z & Lutkenhaus J (1999) Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol Microbiol* 34, 82-90.

Hu Z & Lutkenhaus J (2003) A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum. *Mol Microbiol* 47: 345-355.

Hu Z, Gogol EP & Lutkenhaus J (2002) Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6761-6766.

Hu Z, Mukherjee A, Pichoff S & Lutkenhaus J (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14819-14824.

Huang TP, Lu KM, Chen YH. A Novel Two-Component Response Regulator Links rpf with Biofilm Formation and Virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e62824, 2013.

Lacerda L A (2015) Sistema para depleção de proteínas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Dissertação.

Lee, S. and C.W. Price. 1993. The minCD locus of *Bacillus subtilis* lacks the minE determinant that provides topological specificity to cell division. *Mol. Microbiol.* 7: 601–610.

Lenarcic R, Halbedel S, Visser L, Shaw M, Wu LJ, Errington J, Marenduzzo D, Hamoen LW (2009) Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J* 28: 2272-2282

Leonard TA, Moller-Jensen J & Lowe J (2005) Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360: 523-535.

Levin, P.A., P.S. Margolis, P. Setlow, R. Losick, and D. Sun.1992. Identification of *Bacillus subtilis* genes for septumplacement and shape determination. J. Bacteriol. 174: 6717–6728.

Levin PA, Kurtser IG & Grossman AD (1999) Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 9642-9647.

Li J, WangN. The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. BMC Microbiology v. 12, n. 1, p. 31, 2012.

Lowe J & Amos LA (1999) Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. EMBO J 18: 2364-2371.

Lutkenhaus J (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. Annu Rev Biochem. 76: 539-562.

Lutkenhaus J, Pichoff S & Du S (2012)Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome. Cytoskeleton, doi: 10.1002/cm.21054

Maroto, M & Monk, NAM (2008) Celular oscillatory mechanism Springer Science+Business Media, LLC Landes Bioscience

Marston AL, Thomaides HB, Edwards DH, Sharpe ME & Errington J (1998) Polarlocalization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the midcelldivision site. Genes Dev. 12: 3419-3430.

Marston AL&Errington J (1999)Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localizationand activation of MinC Molecular Microbiology 33(1), 84±96

MilindSL. Preharvest factors affecting fruit quality and postharvest life. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, v. 2, p. 2768-2774, 2003.

Martins PM, Lau IF, Bacci M, Belasque J, do Amaral AM, Taboga SR & Ferreira H (2010) Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiol Lett* 310: 76-83.

Mukherjee A & Lutkenhaus J (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol.* 176: 2754-2758.

Neves MF (2011) O retrato da citricultura brasileira. *Markestrat* 137p.

Parti RP, Biswas D, Helgeson S, Michael FS, Cox A & Dillon JA (2011a) Attenuated virulence of min operon mutants of *Neisseria gonorrhoeae* and their interactions with human urethral epithelial cells. *Microbes Infect* 13: 545-554.

Parti RP, Biswas D, Wang M, Liao M & Dillon JR (2011b) A minD mutant of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 has reduced adherence to human epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 51: 378-383.

Parti RP, Horbay MA, Liao M & Dillon JA (2013) Regulation of minD by oxyR in *Neisseria gonorrhoeae*. *Res Microbiol* 164: 406-415.

Patrick JE & Kearns DB (2008) MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 70: 1166-1179.

Pichoff S & Lutkenhaus J (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *Embo J.* 21: 685-693.

Potluri LP, de Pedro MA & Young KD (2012) *Escherichia coli* low-molecular-weight penicillin-binding proteins help orient septal FtsZ, and their absence leads to asymmetric cell division and branching. *Mol Microbiol* 84: 203-224.

Raski, DM & de Boer PA (1997) The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. *Cell* 91: 685-694.

Raskin DM & de Boer PA (1999a) MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 6419-6424.

Raskin DM & de Boer PA (1999b) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4971-4976.

Reyrat JM, Pelicic V, Gicquel B & Rappuoli R (1998) Counterselectable markers:untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun* 66: 4011-4017.

Rowlett VW & Margolin W (2013) The bacterial Min Sistem. *Curr Biol.* 2013 Jul 8;23(13):R553-6.

Rothfield L, Taghbalout A and Shih YL (2005) Spatial control of bacterialdivision-site placement. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:959–968.

Schaad NW¹, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK. (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (exGabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Rikerand Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov.nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp.nov. *Syst Appl Microbiol* 28: 494-518.

Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE(2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol* 29: 690-695.

Shih YL and Rothfield L(2006). The bacterial cytoskeleton. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 70:729–754.

SriamornsakP. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal*, v. 3, n. 1-2, p. 206-228, 2003.

Stall RE & Seymour CP (1983) Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. *Plant Disease* 67: 581-585.

Sumares JAP, Morão, LG, Martins, PMM, Martins, DAB, Gomes, E, Belasque, J, Ferreira, H (2015) Temperature stress promotes cell division arrest in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* *MICROBIOLOGYOPEN*, v. 00, p. n/a-n/a, 2015.

Thanbichler M & Shapiro L (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126: 147-162.

Ucci AP, Martins PM, Lau IF, Bacci M, Jr., Belasque J, Jr. & Ferreira H (2014)Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.*Microbiologyopen* 3: 29-41.

van Baarle S & Bramkamp M (2010) The MinCDJ system in *Bacillus subtilis* prevents minicell formation by promoting divisome disassembly. *PLoS One* 5: e9850.

Varley, A.W. and G.C. Stewart. 1992. The divIVB region of the *Bacillus subtilis* chromosome encodes homologs of *Escherichia coli* septum placement (MinCD) and cell shape(MreBCD) determinants. *J. Bacteriol.* 174: 6729–6742.

Vauterin L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

Varma A,Huang KC and Young KD (2008)The min system as a general cell geometry detection mechanism: branch lengths in y-shaped *escherichia coli* cells affect min oscillation patterns and division dynamics.*Journal Of Bacteriology*, Mar. 2008, P. 2106–2117

Vicente M, Rico AI, Martinez-Arteaga R & Mingorance J (2006) Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *J Bacteriol.* 188: 19-27.

Wu LJ & Errington J (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 117: 915-925.

YanQ, WangN. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 25, n. 1, p. 69-84, 2012.

Yeh YC, Comolli LR, Downing KH, Shapiro L & McAdams HH (2010) The *Caulobacter* Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. *J Bacteriol* 192: 4847-4858.