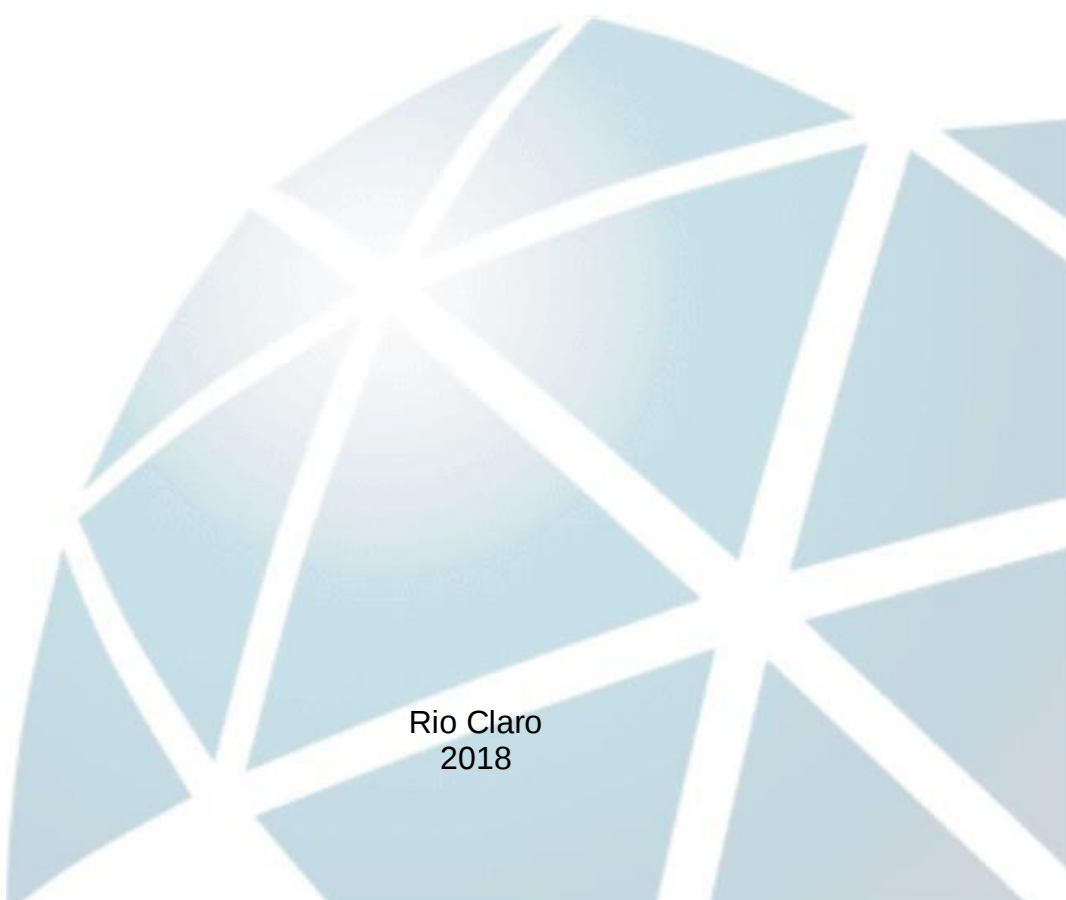

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIANCA DA COSTA SANTOS

**Caracterização funcional da ORF hipotética
XAC3407 codificada por *Xanthomonas citri*
subsp. *citri***



Rio Claro
2018

BIANCA DA COSTA SANTOS

Caracterização funcional da ORF hipotética XAC3407 codificada por
Xanthomonas citri subsp. *citri*

Orientador: Profº Drº Henrique Ferreira

Co-orientador: Kenny Umino Sato

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de
Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela
em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2018

S237c Santos, Bianca da Costa
Caracterização funcional da ORF hipotética XAC3407
codificada por Xanthomonas citri subsp. citri / Bianca da
Costa Santos. -- Rio Claro, 2018
41 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Henrique Ferreira
Coorientador: Kenny Umino Sato

1. ZapB. 2. Divisão celular bacteriana. 3. Cancro cítrico.

I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Ao Profº Drº Henrique Ferreira, pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao Kenny Umino Sato, pela paciência, ensinamentos e dedicação.

À minha família pelo apoio e carinho.

À minha mãe, por tudo.

Ao meu namorado pelo apoio e companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao nosso grupo de pesquisa do laboratório de genética de bactérias, a todos os professores que contribuíram com a minha trajetória acadêmica, ao pessoal da biblioteca, aos meus amigos e a todos que apoiaram de maneira direta ou indireta a realização desse trabalho.

RESUMO

O cancro cítrico é uma doença que afeta os citros de importância econômica e é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*). A infecção por *Xac* produz necroses nas plantas, principalmente nas áreas foliares, também podendo causar queda prematura dos frutos, ocasionando uma diminuição na sua produção e qualidade, além da debilitação da árvore. Frutos sintomáticos podem até ser utilizados para extração de suco, porém, não se adequam ao mercado de mesa. Por ser uma doença incurável, o cancro deve ser evitado mediante erradicação de plantas doentes ou técnicas de manejo que evitam o espalhamento da bactéria pelos pomares. Neste sentido, o conhecimento da biologia do patógeno representa uma das armas para se controlar a doença. Nosso grupo iniciou, há aproximadamente 10 anos, pesquisas sobre o processo de divisão celular de *Xac*, com o intuito de perturbá-lo e inibir o crescimento da bactéria, desenvolvendo também compostos que afetem a principal proteína formadora do septo divisional. Neste trabalho, caracterizamos a ORF hipotética de *Xac* que aparentemente está envolvida na formação do septo. Esta ORF (XAC3407) foi identificada em experimentos de interação proteína-proteína realizados por nosso grupo, onde utilizamos como “isca” outra proteína, ZapA, que faz parte do septo e tem papel na sua formação e estabilização. XAC3407 foi expressa em *Xac* em fusão com *Green Fluorescent Protein* (GFP) em sua porção N-terminal para visualização em microscopia de fluorescência. O padrão de localização observado foi uma barra perpendicular ao eixo longitudinal da célula, disposto no centro do bastonete, co-localizando com o septo de divisão. Nas análises de bioinformática vimos que essa ORF se encontra anotada como ZapB no banco de dados KEGG, além de possuir alta similaridade e identidade com proteínas de organismos próximos também anotadas como ZapB. Apesar de mostrar baixa identidade/similaridade com ZapB de *Escherichia coli*, elas apresentam o mesmo padrão sub-celular, estruturas proteicas relativamente similares e compartilham diversos motivos, além de ambas interagirem com proteínas ZapA. Sendo assim, nossos experimentos sugerem que XAC3407 seja o homólogo de ZapB de *E. coli* em *Xac*.

Palavras-chave: ZapB. Divisão celular bacteriana. Cancro cítrico.

ABSTRACT

Citrus canker is a disease that affects all the commercially important citrus varieties, caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*). Infection generates necrosis in plants, especially in the foliar area, which in severe cases may cause fruit drop, leading to a decrease in production and quality of the fruits. Symptomatic fruits may yet be used by the juice industry; However, they have no use for table market. Citrus canker has no cure, and eradication of infected plants continues to be the best measure to control the spread of the bacterium. Knowledge about the biology of the etiological agent is therefore a good way to devise strategies of disease spread and control. Our group has dedicated efforts to understand the cell division process of *Xac*. Since perturbation of cell division is an excellent strategy to inhibit bacterial growth and infection, we have developed compounds that target the main protein constituent of the divisional septa. Here, we intend to study a novel polypeptide encoded by a hypothetical ORF, XAC3407, which apparently is involved with cell division. This ORF was identified in protein-protein analyses in which we used as “bait” *Xac* ZapA, a well-known cell division/FtsZ-stabilizer factor. XAC3407 was expressed in *Xac* by a fusion with Green Fluorescent Protein (GFP) in its N- terminal and visualized in fluorescent microscopy. The sub-cellular localization pattern observed for this ORF was a perpendicular bar to the longitudinal axis of the cell, arranged in the center of the rod, the middle of the cell, co-localizing with the division septum. In bioinformatic analysis, we observed that this ORF is annotated as ZapB in KEGG database, besides, it also showed high similarity and identity with proteins from related organisms annotated as ZapB. However, in alignment with ZapB from *Escherichia coli* it presented low identity/similarity, but they display the same sub-cellular localization pattern, similar protein structure and share motifs, moreover, both interact with ZapA proteins. Therefore, our experiments suggest that XAC3407 is a homologue to ZapB from *E. coli* in *Xac*.

Keywords: ZapB. Bacterial cell division. Citrus canker.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Citricultura e cancro cítrico	7
1.2	Divisão celular e patogenicidade	10
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVO	14
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1	Linhagens bacterianas e cultivo	15
4.2	PCR e clonagem	15
4.3	Transformação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	18
4.4	Teste do amido	18
4.5	Curva de crescimento.....	18
4.6	Microscopia de fluorescência.....	19
4.7	Análises de bioinformática.....	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1	Construção dos mutantes de <i>Xac</i> expressando GFP-XAC3407	21
5.2	Perfil de crescimento dos mutantes <i>Xac amy::pBCS1</i> e <i>Xac ORF::pBCS1</i>	22
5.3	Padrão de localização sub-celular	22
5.4	Dinâmica de localização de GFP-XAC3407	25
5.5	Busca por proteínas homólogas.....	28
5.5.1	<i>Buscas nos bancos de dados</i>	28
5.5.2	<i>Alinhamento contra base de dados</i>	28
5.5.3	<i>Alinhamento local</i>	29
5.5.4	<i>Busca por interações</i>	29
5.5.5	<i>Estrutura protéica</i>	30
5.5.6	<i>Busca por motivos</i>	31
5.6	Análise geral dos resultados	33
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
	REFERÊNCIAS	35
	APÊNDICE A: Gel de agarose 0,07% com fragmento de XAC3407 (222 pb) amplificado por PCR.....	39
	ANEXO A – Mapa do plasmídeo pBCS1	40
	ANEXO B - Mapa do plasmídeo pGCD21 apontando região amplificada no vetor com os primers GFP F e amy R (a) e região amplificada com XAC3407 inserida no vetor (B)..	40

ANEXO C – Parâmetros de modelagem do monômero de XAC3407.....	41
ANEXO D – Parâmetros de modelagem do dímero de XAC3407.	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citricultura e cancro cítrico

Os citros compreendem um grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família Rutaceae. São representados principalmente por espécies de grande interesse econômico, como as laranjas, limões e limas (NEVES et al., 2010). No Brasil, essas culturas constituem uma atividade econômica de grande importância, gerando empregos de forma direta ou indireta em seu comércio e produção, mantendo o país na liderança do mercado mundial de laranja, a principal espécie cítrica cultivada. Em nível nacional, São Paulo é o estado de referência nesse tipo de agronegócio, detendo cerca de 85% da produção de laranja (14,8 milhões t; 700 mil ha) (MATTOS JUNIOR et al., 2005). Segundo dados do IBGE (2017), estima-se que em 2016 a safra anual de laranjas produzidas no país foi de cerca de 15.983.273 toneladas. Para a safra 2018/2019 é estimada uma produção ao redor de 295,5 milhões de caixas de 40,8 kg (GTACC, 2018).

Apesar da alta produtividade, os citros são suscetíveis a diversas doenças, sendo o cancro cítrico uma das principais, causando desfolha das plantas, lesões, queda prematura e redução na produção de frutos (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Apesar desses efeitos negativos na produção e saúde das plantas, são os impactos na economia que tornam o cancro tão devastador. A doença não está presente em todas as regiões do mundo que os cultivam, portanto, há a necessidade de controles que previnam que ela se introduza e se espalhe em áreas produtoras que ainda não apresentem infecção, mas que possuem um clima favorável à sua proliferação (BRUNINGS; GABRIEL, 2003), o que impõe limites e restrições na exportação e comercialização desses frutos para locais que não apresentam a doença.

Na literatura são descritas cinco estirpes de *Xanthomonas citri* causadoras de cancores, diferindo entre si pelos sintomas que produzem em seus hospedeiros e por sua virulência (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). O cancro cítrico asiático, ou cancorese do tipo A, encontrado originalmente na Ásia, constitui a forma mais severa e difundida da doença (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002), constatado pela primeira vez no Brasil em 1957, nos Estados de São Paulo (região de Presidente Prudente) e Paraná (BITANCOURT, 1957). Seu agente causador é a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*), que possui forma bacilóide, é aeróbica e apresenta motilidade por um flagelo unipolar (GRAHAM et al., 2004).

A infecção por *Xac* ocorre pela entrada da bactéria nos tecidos vegetais através dos estômatos e feridas (SCHUBERT et al., 2001). Os sintomas da doença são bem característicos, mas podem variar sua intensidade de acordo com a resistência da planta ou tipo de órgão afetado (BEHLAU et al, 2007), embora resistência completa ao cancro cítrico seja desconhecida. De acordo com Das (2003), primeiramente ocorre o aparecimento de manchas circulares que crescem em pústulas brancas ou amarelas e escurecem em um tom marrom claro, se tornando espessas e ásperas, podendo ocorrer o surgimento de uma margem de água ao redor do tecido necrótico. Lesões mais antigas tendem a apresentar margens mais elevadas e um halo clorótico de cor amarelada (fig. 1). Com o tempo, os centros das lesões se tornam afundados, o que é mais perceptível nos frutos, apesar disso, essas lesões não penetram com muita profundidade na casca a ponto de afetar sua qualidade interna. Nas folhas, as primeiras manchas aparecem geralmente na superfície abaxial e mais tarde ambas as superfícies se rompem por indução do patógeno (DAS, 2003). Nas lesões mais graves, pode haver desfolhação, morte de galhos, deformação dos frutos, queda prematura das frutas e declínio geral da árvore (SCHUBERT et al., 2001; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

Figura 1 - Lesões do cancro cítrico em folha e ramos.



Fonte: Adaptado de Cavalca (2018, p. 10).

Outra característica do cancro é que o patógeno se multiplica localmente degradando as células vegetais para obter nutrientes (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). A bactéria continua o processo de colonização no ponto de penetração, permanecendo ativa nas margens das lesões (BEHLAU et al, 2017). A doença não possui insetos como vetores, porém a presença de pragas como a *Phyllocnistis citrella*, também conhecida como larva minadora,

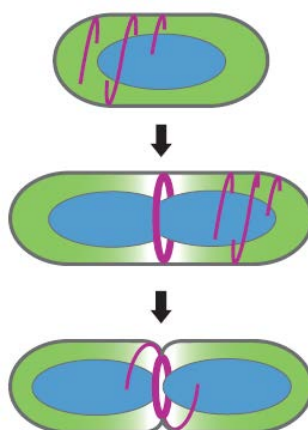
contribui para a disseminação da doença, pois causa ferimentos nas plantas que facilitam a penetração da bactéria (CHAGAS et al., 2001). A propagação do cancro ocorre pela ação combinada de ventos e chuva, que dissemina a bactéria por meio de respingos a longas distâncias. Além disso, a utilização de máquinas, equipamentos, roupas, mudas, entre outros, que estejam contaminadas com *Xac* também podem contribuir para sua disseminação (BEHLAU et al, 2017; SCHUBERT et al, 2001).

De acordo com a instrução normativa nº 21 de 25 de abril de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a qual estabelece os critérios e procedimentos para o estabelecimento e manutenção do status fitossanitário relativo ao cancro cítrico, as áreas nacionais são classificadas em quatro *status* fitossanitários: Área sem ocorrência, estados sem ocorrência prévia ou presente da doença; área livre da praga, domínio específico que não tem ocorrência da doença em um estado onde a doença está presente. Em ambas, as medidas adotadas visam à prevenção, como aquisição de mudas sadias, menos suscetíveis e monitoramento do trânsito de material vegetal. Nas áreas sob erradicação, locais onde a praga ocorre em distribuição restrita ou em baixa incidência em estado onde a doença está presente, o controle se dá por mudas sadias e eliminação das plantas contaminadas ou com suspeitas de contaminação e pela aplicação da calda cúprica. Finalmente, áreas sob sistema de mitigação de risco, locais onde o cancro cítrico está amplamente distribuído em estado onde a doença está presente, categoria na qual se enquadra o estado de São Paulo (BRASIL, 2018a). Nela é feita a integração de pelo menos duas medidas de manejo de risco diferentes, das quais atuam independentemente, e que, cumulativamente, atingem o nível apropriado de proteção contra a praga, como uso de quebra-ventos e aplicação de calda cúprica (BRASIL, 2018b). No Estado de São Paulo, são utilizados basicamente o uso de cultivares resistentes, quebra-ventos e bactericidas cúpricos (BEHLAU, 2007). Os bactericidas cúpricos são utilizados para reduzir a acumulação de inóculos nas folhas novas e proteger a superfície de frutos da infecção, formando uma camada protetora (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Apesar de prover certo controle, a pulverização de cobre tem algumas desvantagens, como a necessidade de várias aplicações em áreas sob grande influência da doença, o que pode causar resistência a esse composto em *Xanthomonas*, citros e outras culturas, e principalmente seu potencial de acumulação no solo, causando fitotoxicidade e efeitos no ambiente (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Além disso, por atuar na superfície, sua efetividade pode ser superada pelas chuvas com vento, que introduzem as bactérias diretamente no estômato (GRAHAM et al., 2004).

1.2 Divisão celular e patogenicidade

A divisão celular bacteriana é um processo essencial à vida. Ter conhecimento sobre este processo é útil para a criação de métodos de controle do crescimento microbiano utilizando a maquinaria de divisão celular como alvo (LOCK; HARRY, 2008). Uma série de proteínas são essenciais para o processo de divisão celular. Dentre elas citamos *Filamentous temperature-sensitive Z* (FtsZ), a qual é codificada por um gene altamente conservado e presente na maioria das bactérias e Archaea (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010). FtsZ é uma GTPase que se polimeriza formando hélices que se condensam para constituir um aparato de divisão em forma de anel (anel Z) ao redor do centro da célula (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010; LUTKENHAUS, 2007) (fig. 2). Sua função primordial é definir o plano de divisão e servir como arcabouço para a formação do septo, estrutura que contém todas as proteínas requeridas para que ocorra a citocinese. A reunião e o posicionamento desse anel são coordenados com a segregação do DNA e o alongamento da célula, garantindo células de tamanhos iguais cada qual com uma cópia do material genético (LEONARD; MØLLER-JENSEN; LÖWE, 2005; LUTKENHAUS, 2007).

Figura 2 – Oscilação das hélices de FtsZ e condensação para formação do anel de constrição.

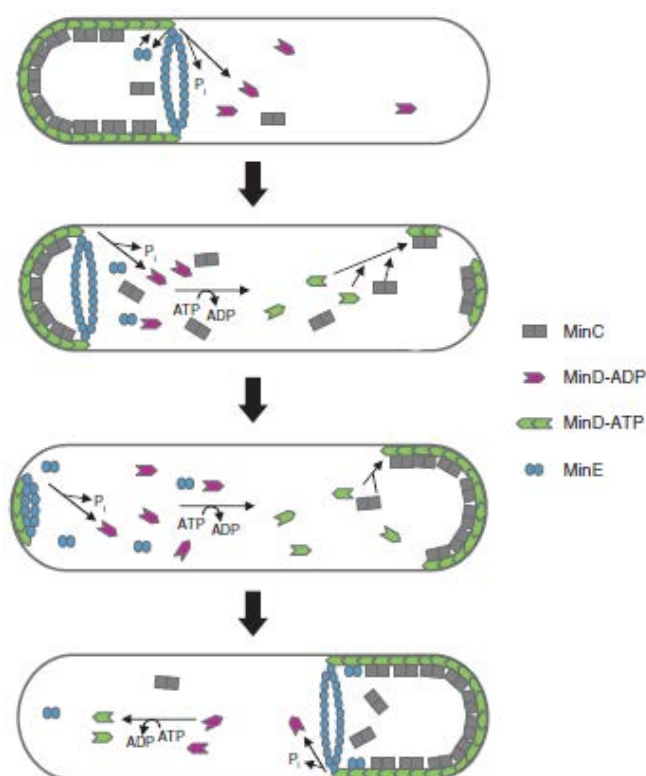


Fonte: Adaptado de Lutkenhaus (2007, p. 542).

O posicionamento do anel Z nas células é feito por meio de reguladores negativos de FtsZ. Portanto, para que o anel Z se estabeleça precisamente no meio da célula o aparato de divisão conta com os sistemas Min e de oclusão de nucleóide (LUTKENHAUS, 2007). Min opera como sensor espacial, amplamente estudado em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (DE BOER; CROSSLEY; ROTHFIELD, 1989; THOMAIDES et al., 2001). A proteína MinC, capaz de inibir a polimerização de FtsZ, se acumula nos polos celulares atraída por MinD-

ATP e evita que o septo se forme em suas proximidades, enquanto MinE causa a liberação das proteínas da membrana restringindo espacialmente a atividade de MinCD (LUTKENHAUS, 2007) (fig. 3). MinC já foi caracterizada por nosso grupo em *Xac* (LORENZONI et al., 2017) e segue o mesmo padrão oscilatório de *E. coli*. A região com menor proporção destes inibidores é onde o septo poderá ser formado, ou seja, no centro das células.

Figura 3 – Oscilação das proteínas Min em *E. coli*.



Fonte: Adaptado de Lutkenhaus (2007, p. 546).

Além destas, há proteínas inibidoras de FtsZ (SlmA em *E. coli* e NOC em *B. subtilis*) que se ligam ao DNA e evitam o seu guilhotinamento na região de formação do septo (BERNHARDT; DE BOER, 2005; WU; ERRINGTON, 2004). Como resultado da atuação destas últimas, o septo nunca fecharia por completo sobre um nucleóide antes da segregação completa do cromossomo.

Além das proteínas inibitórias, temos também outras que estimulam e/ou modulam a formação e função do septo divisional como as Zaps (DURAND-HEREDIA et al., 2012; DURAND-HEREDIA et al., 2011; EBERSBACH et al., 2008; GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002; MARTEYN et al., 2014). A primeira a ser descrita, *FtsZ associated protein A* (ZapA) interage diretamente com FtsZ, se ligando a ela e estimulando o agrupamento e estabilização dos seus protofilamentos (resultado da polimerização de monômeros de FtsZ) (GUEIROS-

FILHO; LOSICK, 2002). Esta proteína foi descrita inicialmente em *B. subtilis* e, embora estimule a formação do anel Z, ela não é considerada essencial. Entretanto, ZapA se torna indispensável em células com níveis reduzidos de FtsZ, antagonizando a superprodução de MinCD e promovendo a polimerização do FtsZ *in vivo* (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Em *Xac*, mostramos que ZapA é codificada pela ORF XAC3408, e igualmente ao observado em *B. subtilis*, ela não é essencial (MARTINS et al., 2010).

As demais proteínas Zap (B, C, D e E) possuem papel redundante em divisão e aparentemente todas estimulam e estabilizam a formação do anel Z em diversos grupos bacterianos. Contudo, atenção extra deve ser despendida com ZapB (EBERSBACH et al., 2008; GALLI; GERDES, 2010; GALLI; GERDES, 2012), que aparentemente conecta segregação cromossômica e divisão celular em *E. coli* (ESPÉLI, 2012). ZapB apresenta interação com ZapA, que por sua vez, interage com a FtsZ auxiliando na formação do septo de divisão (GALLI; GERDES, 2012). A região do término de replicação do cromossomo bacteriano é, em parte, organizada para segregação/partição pela ação da proteína MatP, que se liga a assinaturas moleculares contidas nesta região, elementos *cis* designados *matS*, e a ZapB localizada no septo (MÄNNIK et al., 2016).

Por serem muito conservados em diferentes espécies, os membros da família ZapA são provavelmente fatores comuns nas maquinarias de divisão celular bacterianas. A proteína ZapA inicialmente descoberta na bactéria Gram-positiva *B. subtilis* (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002) foi identificada por nós em *Xac* (MARTINS et al., 2010). Em estudos subsequentes de duplo híbrido em leveduras onde utilizamos ZapA de *Xac* como “isca”, identificamos a proteína codificada pela ORF XAC3407 como o interactante mais frequente, exceto, claro, a própria ZapA, conhecida por formar dímeros (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a localização sub-celular da proteína codificada pela ORF XAC3407 em fusão com GFP (GFP-XAC3407) e identificar se seu padrão de localização aponta para o esperado de outras Zaps, ou seja, uma localização no septo de divisão. Além disto, utilizamos ferramentas de bioinformática para estudar as possíveis semelhanças entre o produto da ORF XAC3407 com proteínas de outros organismos, como a ZapB de *E. coli*.

2 JUSTIFICATIVA

O processo de divisão celular bacteriana é essencial para a vida e proteínas que participam deste processo são excelentes alvos para o desenvolvimento de antimicrobianos (LOCK; HARRY, 2008). Dentre as vantagens de se utilizar tais proteínas como alvos citamos sua ampla distribuição e conservação no Domínio Bacteria e inexistência ou baixa homologia com genes em eucariotos derivados. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a desenvolver antimicrobianos que possam ser utilizados para o controle do cancro cítrico, doença causada por *Xac*, e que sejam necessariamente menos danosos ao meio ambiente em comparação com formulações a base de cobre. Experimentos de duplo-híbrido em leveduras, conduzidos por nosso grupo utilizando banco desenvolvido por Alegria et al. (2004), identificou o produto da ORF XAC3407 como interactante de ZapA de *Xac* (MARTINS; FERREIRA, 2009), uma proteína acessória que estimula a formação do septo bacteriano (GUEIRROS; LOSICK, 2002). Na presente proposta, estudamos a localização do produto codificado por XAC3407 (quando em fusão com GFP) em microscopia de fluorescência. Sua localização sub-celular indica que ela tem atuação no septo de divisão e provavelmente é o homólogo de ZapB em *Xac*. Os resultados do presente trabalho fornecem material para posteriores investigações sobre o processo de divisão celular em *Xac* e constitui ferramenta para o *screening* de novos antimicrobianos visando o septo.

3 OBJETIVO

Estudar o padrão de localização sub-celular da proteína codificada pela ORF XAC3407 de *Xanthomonas citri* subsp *citri* e seu possível envolvimento com divisão celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e cultivo

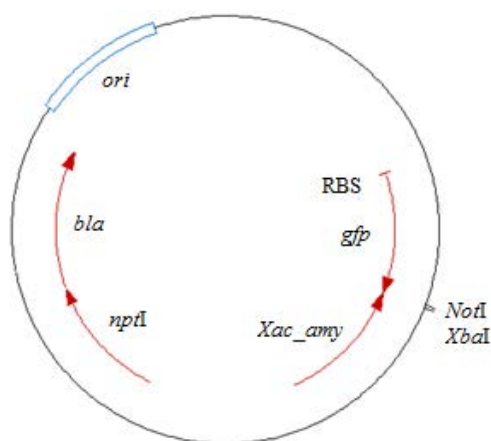
A linhagem *Xanthomonas citri* 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) utilizada no presente estudo foi sequenciada por Da Silva et al. (2002). *Xac* foi cultivada a 29°C em meio NYG (Peptona 5 g/L, extrato de levedura 3 g/L e glicerol 20 g/L) com ou sem ágar 1,5%. Para clonagem foi utilizada *Escherichia coli* DH10B, cultivada em meio LB a 37°C, acrescido ou não de ágar 1,5%, com antibiótico Ampicilina adicionado ao meio de cultivo, quando necessário, na concentração final de 20 µg/ml.

4.2 PCR e clonagem

Técnicas básicas de Biologia Molecular e preparo de soluções seguiram Maniatis et al. (1982). Extração de DNA total de *Xac* foi realizado com o kit Invisorb Spin Tissue Mini (Invitex, código 10321003). Desenho de primers foi realizado manualmente com checagem de estruturas secundárias, possibilidade de formação de dímeros e grampos, com auxílio do programa livre GeneRunner¹. Todos os DNAs foram averiguados por sequenciamento de Sanger (dados não mostrados). Linhagens de *Xac* averiguadas por PCR diagnóstico (dados não mostrados). O vetor de expressão utilizado foi o pGCD21 (fig. 4), desenvolvido pelo grupo e disponível em nosso laboratório (LORENZONI et al, 2017). Tal vetor permite a expressão em *Xac* de proteínas de fusão contendo GFP em suas extremidades C- ou N-terminal, possui origem de replicação para *E. coli* (útil nos passos de clonagem), carrega o promotor de arabinose derivado de plasmídeos da série pBAD (LACERDA et al., 2017) e carrega fragmento do gene de alfa-amilase de *Xac* (*amy*), que permite a integração estável do vetor no cromossomo (MARTINS et al, 2010).

¹ Gene Runner. Version 6.5.51x64 Beta, [1992-2018]. Frank Buquicchio and Michael Spruyt.

Figura 4 – Mapa do plasmídeo pGCD21 mostrando as enzimas utilizadas na clonagem (*NotI/XbaI*), origem de replicação (*ori*), resistência aos antibióticos Canamicina (*nptI*) e à Ampicilina (*bla*), sítio de ligação ao ribossomo (RBS), sequência de aminoácidos codificantes para GFP (*gfp*) e fragmento de gene de alfa-amilase (*Xac_amy*).



Fonte: Adaptado do software Clone Manager² (2018).

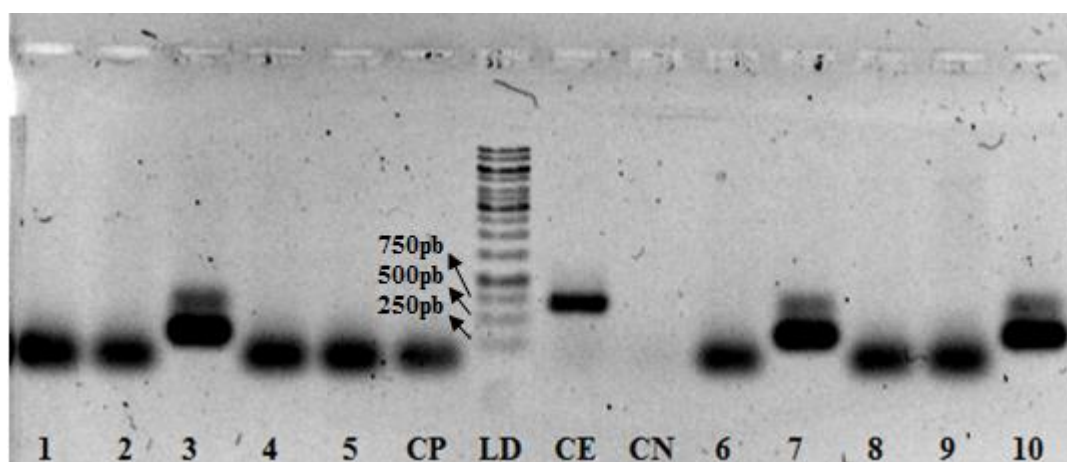
A amplificação dos fragmentos da ORF3407 (222 pb) (ver apêndice A) se deu em reação de 50 µl utilizando-se 0,5 µM dos primers 3407 F (5'- GATGAACTATACAAAGAAGCAGGC GGCCGCATGGACAACGCTGCC 3') e 3407 R (5' AGCATGCAGCAGCTCCCGGGTCA TTCTAGATCACGTGTGCTGCTC 3') e 0,02 U/µL de DNA polimerase Phusion (Thermo Scientific), contendo ainda: 200 µM de mistura de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ (tampão da enzima conforme instruções do fabricante) e 3% de DMSO. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos e 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos. O produto foi purificado do gel utilizando o GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific #K0692), adicionando tampão de ligação no volume de 2:1, incubando a 60°C por 10 min, acrescentando isopropanol 100% no volume de 1:1 (necessário para fragmentos menores que 500pb), transferindo a reação para coluna de purificação, centrifugando (a 12.000 rpm) e adicionando tampão de lavagem, seguida por centrifugação da coluna vazia para retirada de etanol residual e então eluído em 50 µl de tampão de eluição. Digestão do fragmento com as enzimas *NotI/XbaI* (Thermo Scientific), em reação de 50 µl deixada em banho de 37°C por 1 hora e posteriormente 20 min a 80°C, sendo que o vetor de expressão foi digerido com uma das enzimas, purificado de gel utilizando o GeneJET Gel Extraction Kit de acordo com protocolo descrito acima e então digerido com a outra enzima para garantir que o vetor foi completamente digerido.

² Clone Manager 6. Version 6.00. Denver - CO, USA: Scientific & Educational Software, 2000.

Ligação entre vetor e fragmento de XAC3407 feita em reação de 20 µl totais com T4 DNA ligase (Thermo Scientific), incubada em termociclador a 16°C por 12 horas e inativação da enzima com 65°C por 10 min. Transformação realizada em células competentes de *E. coli* DH10B através de choque térmico, onde foram adicionados 100 µl de células competentes em 10 µl de ligação. Foram mantidas em gelo por 20 minutos e depois expostas 1 minuto a 42°C e deixada 2 minutos novamente em banho de gelo. Foram adicionados 800 µl de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora. O produto das transformações foi plaqueada em 3 placas de LB ágar com o antibiótico ampicilina (20 µg/ml), incubadas a 37°C por 16 horas para seleção de colônias.

Foi feito repique de 10 colônias transformantes em placa LB ágar e realizado PCR de colônia para seleção das que apresentaram o vetor pBCS1 (XAC3407::pGCD21) (ver anexo A) (fig. 5). Reação se deu em 20 µl utilizando 1,25 unidades da polimerase *Taq* (GeneDireX) e 0,2 µM dos primers GFP F (5' ACACATGGCATGGATG 3') e amy R (5' ACGACTTTCCGCT GTTC 3'), contendo ainda 100 µM de mistura de dNTPs e 2 mM MgCl₂ (tampão da enzima conforme instruções do fabricante). As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min e 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos. Os primers amplificam o vetor nas regiões adjacentes ao local de inserção do fragmento (130 pb), portanto, colônias com pBCS1 amplificaram 352 pb, pois contém mais 222 pb referentes a ORF XAC3407 (ver anexo B).

Figura 5 – Gel de agarose 0,7% mostrando os fragmentos amplificados por PCR de colônia dos transformantes. CP: pGCD21; CE: controle negativo com *E. coli* sem plasmídeo; CN: controle negativo da reação sem DNA molde; LD: *ladder*; colônias transformantes representadas por números de 1 a 10.



Fonte: Próprio autor (2018).

Foi feita miniprep das colônias que apresentaram o vetor pBCS1 (colônias 3, 7 e 10) utilizando GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0503), ressuspensando o *pellet* de células em 250 µl de solução de ressuspensão, adicionando 250 µl de solução de lise e 350 µl de solução de neutralização, com centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm. Sobrenadante foi transferido para coluna de purificação, lavado duas vezes com 500 µl de tampão de lavagem, centrifugado para retirada de etanol residual e eluído em 50 µl de tampão de eluição. Após isso, o material seguiu para sequenciamento.

4.3 Transformação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Seguiu o protocolo para transformação de *Xac* descrito pelo grupo com modificações (Ferreira et al, 1995). *Xac* foi cultivada em 100 ml de meio NYG a 29°C e 200 rpm por 16h. Massa celular referente a este cultivo foi coletada por centrifugação a 3000 xg e lavada por centrifugação em água gelada esterilizada por três vezes para remoção completa de sais do meio de cultivo. As células foram ressuspensas em 1 ml de água gelada esterilizada, das quais 100 µl foram dispostos em cubetas de eletroporação (BioRad) com separação de eletrodos de 0,2 cm, misturadas com 10 µl do vetor pBCS1 e submetidas a choque de 2400 v por 5 ms. Foram adicionados 800 µl de meio NYG e as células foram cultivadas por 4 h com leve agitação (100 rpm) antes do plaqueamento em meio NYG sólido seletivo com Canamicina (20 µg/ml).

4.4 Teste do amido

As colônias resultantes da transformação, juntamente com a *Xac* selvagem, foram plaqueadas em placa de NYG ágar com amido solúvel 0,2% e incubadas a 29°C por 24 horas. Após isso, a placa foi exposta ao vapor de iodo.

4.5 Curva de crescimento

O experimento foi feito em triplicata em placa de 24 poços, ajustando a D.O. 600nm das amostras para 0,1 e aplicando 1,5 ml em cada poço. Os dados de D.O. 600nm foram coletados

a cada 30 minutos por 48 horas pela leitora de placas e adicionados ao software Prism³ para gerar um gráfico com sobreposição de curvas a partir da média da D.O. 600nm.

4.6 Microscopia de fluorescência

As células foram cultivadas a 29°C na D.O. 600nm 0,1 e observados a partir de 0,3 a cada 30 minutos em Microscópio BX-61 Olympus de fluorescência equipado com câmera monocromática OrcaFlash 2.8 (Hamamatsu). Para a visualização, 5 µl de cada cultura foi imobilizado em lâmina de solução salina (NaCl 0,85%) com agarose 0,85%. Também foi feito um *time lapse* do mutante Xac *amy::pBCS1* número 3 (mutante 3), visualizado 1 hora após indução com 0,03% de arabinose na D.O. 600nm 0,3, imobilizado em lâmina de meio NYG ágar 1%, com fotos a cada 15 minutos por 5 horas. Para a visualização de proteínas marcadas com GFP, as células foram observadas diretamente, sem coloração, utilizando-se filtro específico. Captura e processamento de imagens se deu com o software CellSens Dimension⁴.

4.7 Análises de bioinformática

Busca por informações em banco de dados referentes a ORF XAC3407 foram realizadas no KEGG (OGATA et al., 1999a), UniProt (BATEMAN et al., 2017), InterPro (FINN et al., 2016) e GenBank (BENSON et al., 2013).

Alinhamento contra a base de dados utilizou BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997), nos seguintes parâmetros: *database: non-redundant protein sequences (nr); max target sequences: 100; expect threshold: 10; word size: 6; matrix: BLOSUM62; gap costs existence: 11 Extension: 1; conditional compositional score matrix adjustment.*

Alinhamento de sequências foi realizado com EMBOSS-Water (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000), com os seguintes parâmetros: *matrix: BLOSUM62; gap open: 10; gap: 0,5; output format: pair.*

Investigação de domínios proteicos usou PFAM (FINN et al., 2016b). Para análise de interação entre proteínas usou-se o programa STRING (VON MERING et al., 2003), nos seguintes parâmetros: *meaning of network edges: evidence; active interaction sources: textmining, experiments, databases, co-expression, neighborhood, gene fusion e co-occurrence; minimum required interaction score: medium confidence (0.400); max number of*

³ Prism. Version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

⁴ CellSens Dimension. Versão 11. Olympus Corporation. Tóquio, Japão

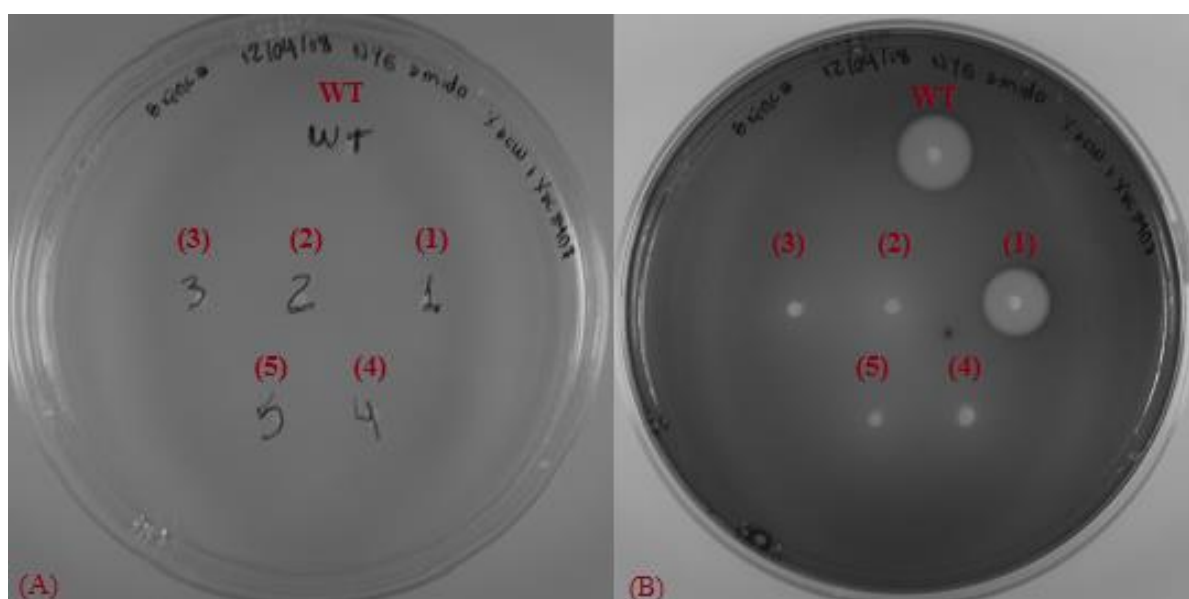
interactors to show: 1st shell (no more than 5 interactors), 2nd shell (none); network display mode: interactive svg. Modelos para investigação de estruturas terciárias realizados no SWISS-MODEL (BERTONI et al., 2017), utilizando “2JEE.1.A: CELL DIVISION PROTEIN ZAPB” como molde.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção dos mutantes de *Xac* expressando GFP-XAC3407

O vetor de expressão pBCS1, que carrega *gfp-XAC3407* sob controle do promotor de arabinose, foi transformado em *Xac* com o intuito de se produzir mutantes capazes de expressar a fusão GFP-XAC3407. Para distinguirmos o sítio de integração do vetor em *Xac*, prováveis mutantes foram selecionados em meio NYG contendo amido solúvel (fig. 6), sendo (A) antes e (B) após o contato com iodo, que reage com o amido na placa marcando-o com uma cor azul-intensa.

Figura 6 - Teste do amido. Mutantes foram inoculados em meio NYG com amido solúvel e expostos a vapor de iodo para checar a integração no plasmídeo no genoma. WT: *Xac* selvagem; seguida pelos mutantes *Xac amy::pBCS1* número 2, 3, 4 e 5 e *Xac ORF3407::pBCS1* número 1.



Fonte: Próprio autor (2018).

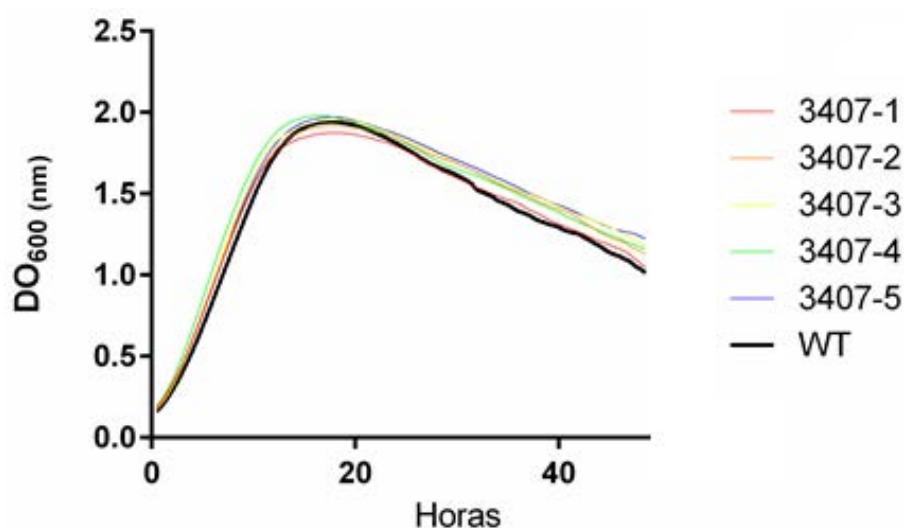
Devido a presença de um fragmento do gene *amy* (responsável pela codificação da enzima que degrada o amido) no vetor utilizado, existiam duas possibilidades de recombinação homologa e consequente integração no genoma. Vemos que o isolado 1 apresenta halo de degradação, indicando funcionalidade do gene *amy*, apontando, consequentemente, que sua integração ocorreu na ORF. Já para os isolados 2, 3, 4 e 5, vemos ausência de halo, indicando

que houve integração do vetor no locus *amy*, que foi interrompido. As linhagens foram testadas por PCR diagnóstico (dados não mostrados) e designadas para análises subsequentes.

5.2 Perfil de crescimento dos mutantes *Xac amy::pBCS1* e *Xac ORF::pBCS1*

Os mutantes de *Xac amy::pBCS1* e *Xac ORF::pBCS1* foram avaliados em curvas de crescimento para a seleção daqueles com melhor *fitness* (fig. 7).

Figura 7 - Curva de crescimento dos mutantes *Xac amy::pBCS1* (3407-2, 3, 4 e 5); *Xac ORF3407::pBCS1* (3407-1) e *Xac* selvagem (WT), gerada a partir das médias da D.O. 600 nm.



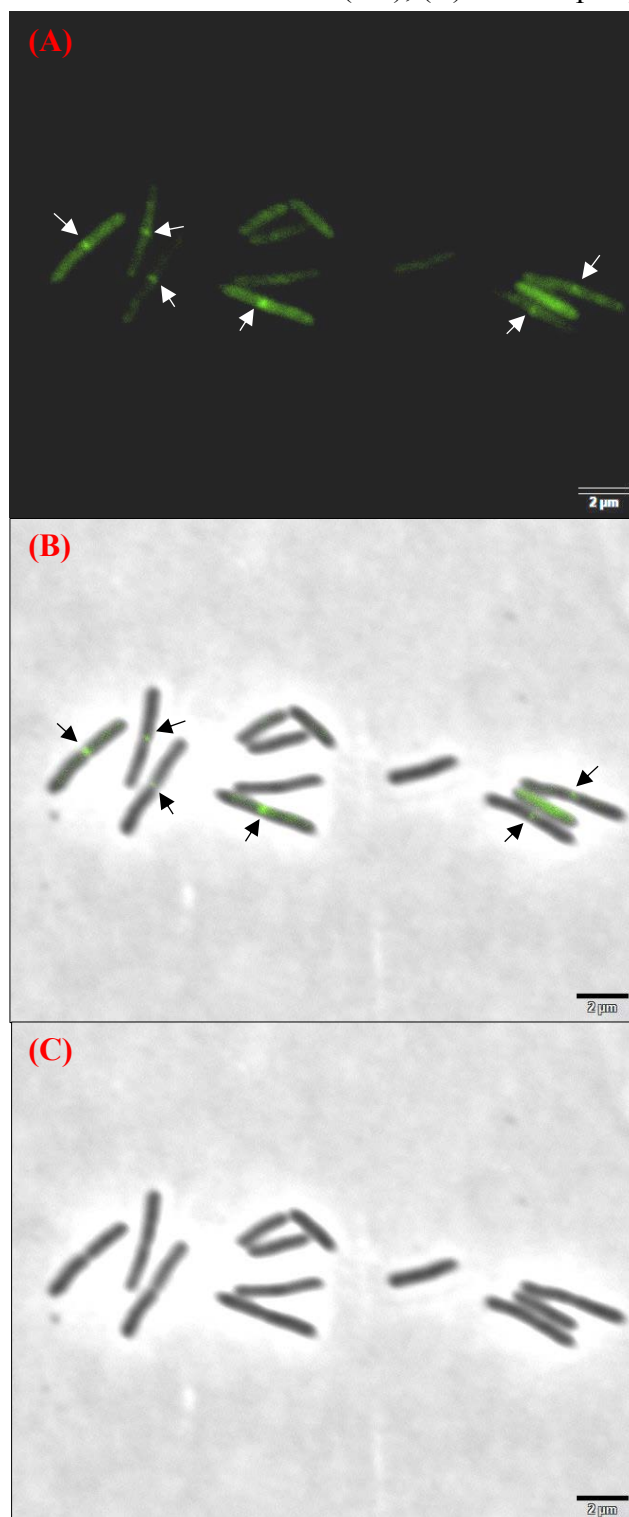
Fonte: Adaptado do software Prism (2018).

Vemos aqui que todos os mutantes avaliados apresentaram perfil de crescimento semelhante ao isolado selvagem, indicando que, provavelmente, a mutação não interferiu no crescimento das bactérias. Decidiu-se assim, seguir com os cinco mutantes para os testes de microscopia.

5.3 Padrão de localização sub-celular

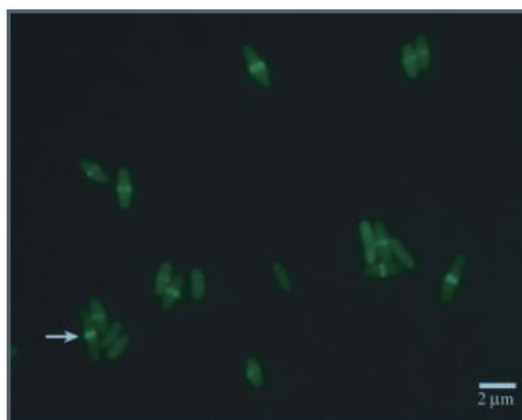
Foram realizadas microscopias de fluorescência dos mutantes para detecção de GFP-XAC3407 após indução com arabinose 0,03% para identificar seu padrão de localização sub-celular (fig. 8).

Figura 8 – Localização sub-celular de GFP-XAC3407. O mutante 3 foi cultivado em NYG a 29°C até a D.O. 600 nm 0,3. Imagens após 2 horas e 30 minutos de indução com arabinose 0,03%. A localização de GFP-XAC3407 está indicada pelas setas. (A) filtro para GFP; (B) sobreposição dos filtros GFP e contraste de fase (PH); (C) PH. Ampliação 100X; barra= 2 μ m



Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 9 - Localização sub-celular de GFP- ZapA em *Xac amy::pPM2a-XAC3408*, vista em microscopia de fluorescência.



Fonte: Martins et al. (2010, p. 81).

Figura 10 – Localização sub-celular de GFP-ZapB em *E. coli* BW25113, vista em microscopia de fluorescência.



Fonte: Adaptado de Buss (2013, p. 128).

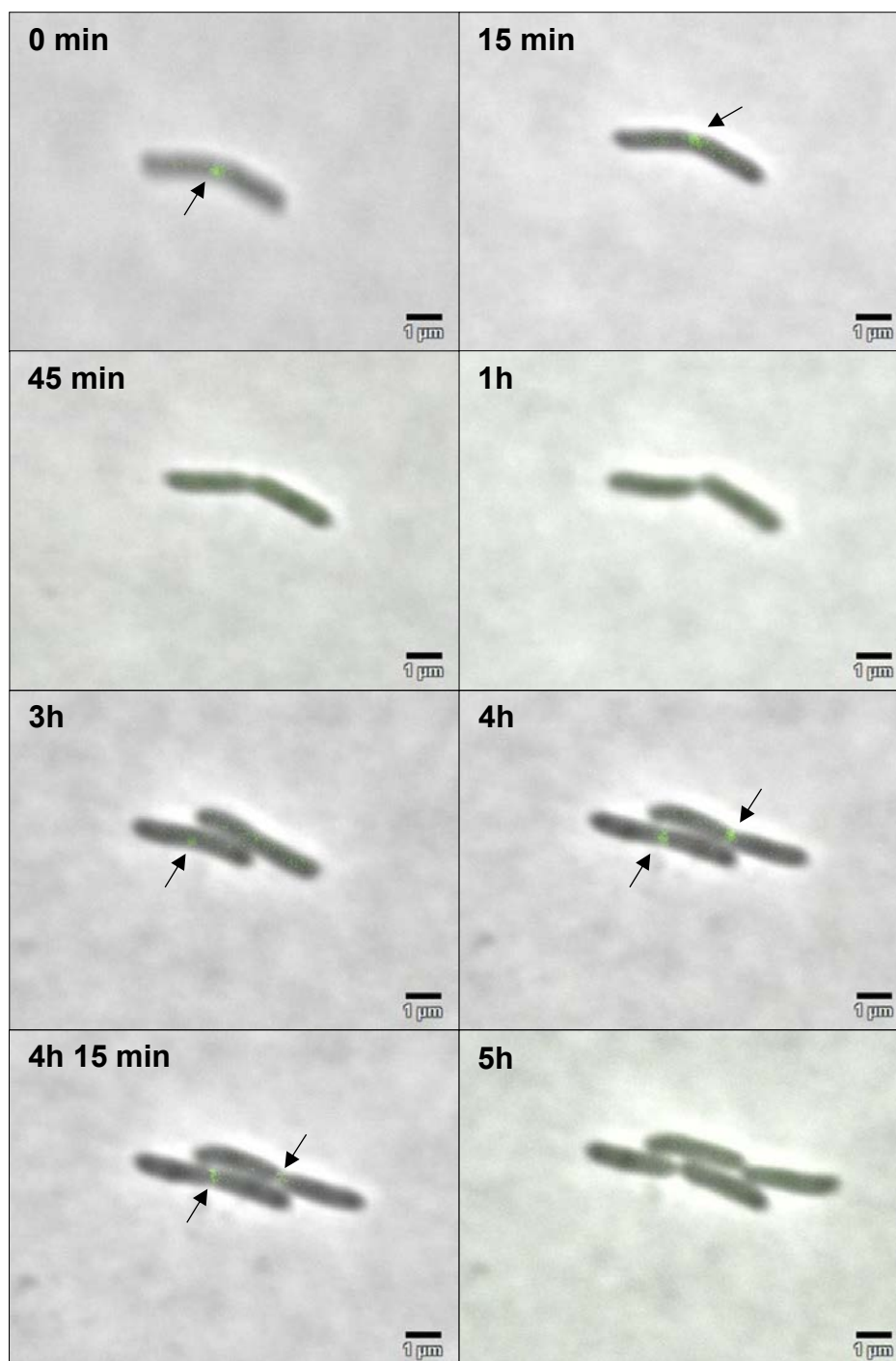
Na figura 8 mostramos o perfil do mutante 3, ressaltando que os demais apresentaram perfis semelhantes. A expressão da proteína de fusão GFP-XAC3407 em *Xac* produziu uma barra perpendicular ao eixo longitudinal das células com localização no centro dos bastonetes. Notamos também que o padrão de localização apresentado por GFP-XAC3407 em *Xac* foi semelhante aos padrões de GFP-ZapA na mesma bactéria (fig. 9) e GFP-ZapB de *E. coli* (fig. 10). Embora tenhamos observado fluorescência dispersa em algumas células expressando GFP-XAC3407 em *Xac*, o padrão de localização observado foi consistente com atuação desta fusão na região do septo divisional. Finalmente, o mutante 3 não apresentou vazamento do promotor, onde o padrão de localização documentado só foi observado mediante exposição ao

indutor arabinose. Desta forma, selecionamos tal mutante para a realização dos experimentos de *time lapse*.

5.4 Dinâmica de localização de GFP-XAC3407

Para que pudéssemos estudar a dinâmica de localização de GFP-XAC3407 em função do tempo foi realizado um *time lapse*, onde observamos células isoladas do mutante 3 em microscopia de fluorescência por período de 5h (fig. 11).

Figura 11 - Localização sub-celular de GFP-XAC3407 ao longo do tempo a partir de observação do mutante 3. Células foram cultivadas em NYG a 29°C até a D.O. 600 nm 0,3 e visualizado após 1 horas de indução com arabinose 0,03%, com fotos a cada 15 min. Imagens com sobreposição dos filtros de GFP e contraste de fase (PH). Setas indicando a localização sub-celular de GFP-XAC3407. Ampliação 100X; barra= 1 μ m.



Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 12- Localização sub-celular dinâmica de GFP-ZapB em *E. coli* MC1000, vista em microscopia de fluorescência.

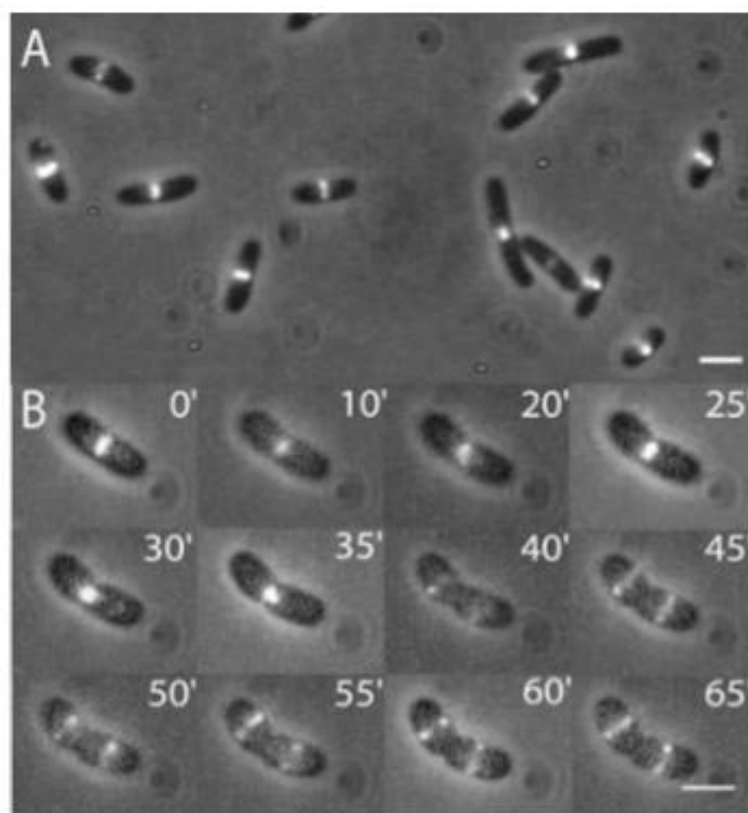


Fig. 3. Dynamic subcellular localization of ZapB. Combined phase-contrast and fluorescence microscopy images showing the localization of ZapB-GFP in living cells of strain MC1000. Cells were grown at 37°C in M9 glucose medium supplemented with casamino acids. Expression of ZapB-GFP from plasmid pEG3a was induced by addition of arabinose as described in Experimental procedures.

A. Fluorescent images using a GFP filter were taken immediately after mounting the cells under the microscope.

B. Time lapse series. Fluorescent images were taken every 5 min with GFP filter. Scale bars are 2 μm. The different cell morphologies in A and B was due to differences in growth conditions (growth in liquid versus solid medium).

Fonte: Ebersbach et al. (2008, p. 724).

Na figura 11, vemos que GFP-XAC3407 pode ser visualizada na região do septo divisional durante o processo de divisão celular (tempos 0-15 min), e tão logo a divisão ocorra, o sinal de GFP-XAC3407 se dispersa pelo citoplasma e permanece desta forma durante o crescimento vegetativo bacteriano subsequente (tempos 45 min a 1h). Na sequência, nota-se novo início de condensação de fluorescência na região septal no tempo 3h, que se torna mais evidente no tempo 4h, quando é possível já observar constrição entre futuras células filhas. Com a conclusão do processo no tempo 5h, vemos novamente a dispersão do sinal.

Finalmente, GFP-XAC3407 adotou o mesmo padrão sub-celular de GFP-ZapB de *E. coli*, ou seja, localização no centro da célula durante no momento da divisão (fig. 12). Concluimos assim que XAC3407 é requerida na região de divisão celular e que provavelmente atue neste processo.

5.5 Busca por proteínas homólogas

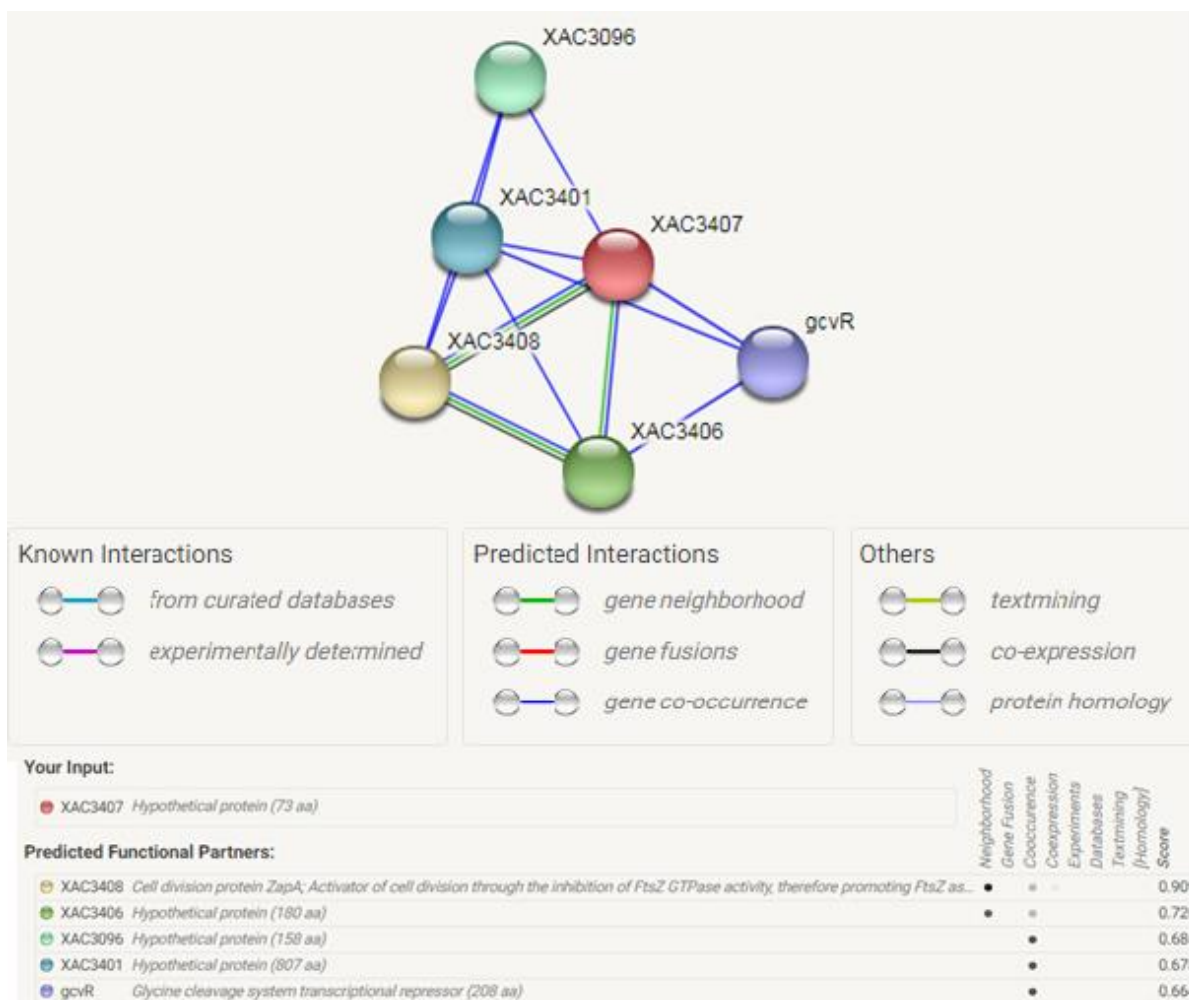
5.5.1 Buscas nos bancos de dados

Ainda há algumas divergências com relação à anotação de ORF XAC3407 em bancos de dados. No banco de dados KEGG, ela se dispõe como uma proteína hipotética conservada, já anotada como ZapB de *Xanthomonas citri* subsp *citri* (entry Q8PH53). Porém, curiosamente, em outros bancos de dados como UniProt (entry Q8PH53), GenBank (entry AAM38250.1) e InterPro (entry IPR012662), essa ORF ainda consta como hipotética e de função desconhecida.

5.5.2 Alinhamento contra base de dados

Em busca por homologias utilizando BLASTp, XAC3407 obteve *hit* específico (100% de identidade) como sendo uma proteína hipotética conservada pertencente à família TIGR02449, da qual seus membros são pequenas proteínas com tradicionalmente 73 aminoácidos, com cópias únicas presentes em diversas Proteobacterias, como *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Xanthomonas campestris*, com função desconhecida (MARCHLER-BAUER, 2017). Além desses resultados, também foi apontada identidade/similaridade com proteínas anotadas como ZapB dos seguintes microorganismos: *Pseudoxanthomonas wuyuanensis* (79% de identidade e 90% de similaridade), *Pseudoxanthomonas indica* (78% de identidade e 86% de similaridade), *Stenotrophomonas maltophilia* (77% de identidade e 86% de similaridade) e *Ectothiorhodospira marina* (57% de identidade e 68% de similaridade). Ou seja, essa ORF possui bastante identidade (entre 57% e 79%) e similaridade (entre 68% e 90%) com proteínas de outros organismos também anotadas como ZapB, sendo que *Pseudoxanthomonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. fazem parte, juntamente com *Xac*, da família das Xanthomonadaceae.

Figura 14 - Interações de XAC3407.



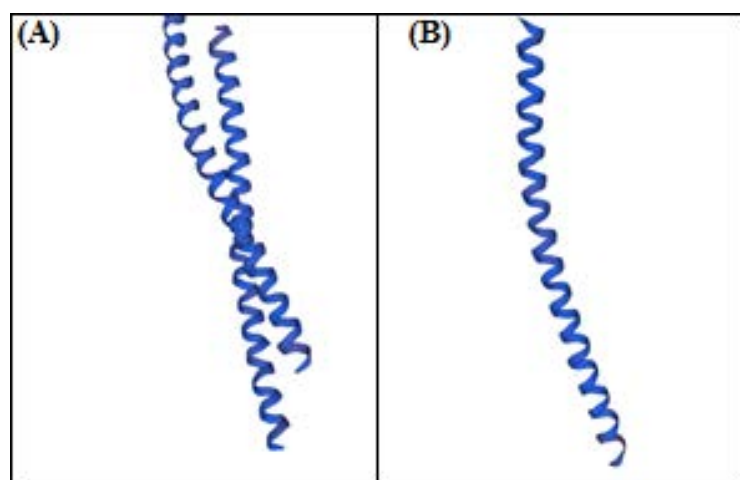
Fonte: Adaptado de STRING (2018).

Os resultados obtidos apresentam XAC3408 (ZapA) como o parceiro funcional/interactante mais provável de XAC3407 (*score* de 0,909). Esses dados corroboram os experimentos de duplo híbrido realizado por Martins e Ferreira (2009), no qual ZapA (XAC3408) e XAC3407 são interactantes.

5.5.5 Estrutura protéica

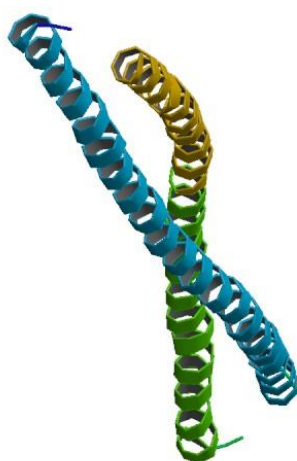
Modelagem estrutural utilizando ZapB de *E. coli* (código PDB: 2JEE) como molde (fig. 15). Parâmetros de modelagem (ver anexo C e D)

Figura 15 – Estrutura protéica homodimérica (A) e monomérica (B) de XAC3407 geradas no SWISS-MODEL.



Fonte: Adaptado de SWISS-MODEL (2018).

Figura 16 –Estrutura em raio-X de *E. coli* YiiU. Código PDB: 2JEE.



Fonte: Ebersbach et al. (2008).

A modelagem resultou em uma proteína de estrutura helicoidal, rica em alfa-helices, similar à estrutura quaternária de ZapB de *E. coli* (fig. 16)

5.5.6 Busca por motivos

Busca por motivos de XAC3407 (fig. 17) e ZapB de *E. coli* (fig. 18) no KEGG/PFAM.

Figura 17 – Motivos de XAC3407.**SSDB Motif Search Result**

Organism : Xanthomonas citri pv. citri 306

Gene : XAC3407

Definition : K09892 cell division protein ZapB | (GenBank) conserved hypothetical protein

Motif id	From	To	Definition	E value	Score
pf:APG6	5	65	Autophagy protein Apg6	0.12	-
pf:DUF2203	6	69	Uncharacterized conserved protein (DUF2203)	0.61	-
pf:Taxilin	7	70	Myosin-like coiled-coil protein	0.0081	-
pf:Sec34	7	59	Sec34-like family	0.044	-
pf:CENP-H	7	70	Centromere protein H (CENP-H)	0.49	-
pf:TBPIP	8	72	Tat binding protein 1(TBP-1)-interacting protein (TBPIP)	0.0054	-
pf:T3SSipB	8	70	Type III cell invasion protein SipB	0.0075	-
pf:IncA	8	70	IncA protein	0.011	-
pf:SKA2	8	66	Spindle and kinetochore-associated protein 2	0.067	-
pf:DUF3450	8	71	Protein of unknown function (DUF3450)	0.18	-
pf:DivIC	8	39	Septum formation initiator	0.26	-
pf:ZapB	9	69	Cell division protein ZapB	8.1e-06	-
pf:NRBF2	9	42	Nuclear receptor-binding factor 2, autophagy regulator	0.033	-
pf:DUF2937	10	37	Protein of unknown function (DUF2937)	0.24	-
pf:YabB	11	59		0.0057	-
pf:LPP20	14	67	LPP20 lipoprotein	0.19	-
pf:bZIP_1	15	53	bZIP transcription factor	0.0015	-
pf:Herpes_BLRF2	16	55	Herpesvirus BLRF2 protein	0.00097	-
pf:bZIP_2	16	41	Basic region leucine zipper	0.19	-
pf:JIP_LZII	17	54	JNK-interacting protein leucine zipper II	0.063	-

Fonte: Adaptado do KEGG (2018).

Figura 18 – Motivos de ZapB de *E. coli*.

Entry	b3928	CDS	T00007
Gene name	zapB		
Definition	(RefSeq) FtsZ stabilizer, septal ring assembly factor, cell division stimulator		
KO	K09892 cell division protein ZapB		
Organism	eco Escherichia coli K-12 MG1655		
Motif	Pfam: ZapB DUF3450 PspA_IM30 Seryl_tRNA_N KASH_CCD Leu_zip YabB HemX Herpes_UL6 CENP-F_leu_zip ADIP Filament betaPIX_CC CtIP_N DUF4763 HAUS-augmin3 Uso1_p115_C BRE1 TMF_TATA_bd Cep57_CLD_2 She9_MDM33 dCache_2 IncA DUF4201 DUF4795 APG6 GIT_CC Jnk-SapK_ap_N DUF4140 DUF4757 NTR2 TBPIP DUF1664 HMMR_N DUF4407 Spc7 COG6 Atg14 FlaC_arch CENP-H Tox-ODYAM1 CLZ Sec34 DctP Occludin_ELL DivIC Tropomyosin_1 DUF2203 CP12 DUF2205 BLOC1_2 Prominin TMPIT Tho2 CCDC-167 DUF2968 V_ATPase_I bZIP_2		

Fonte: Adaptado do KEGG (2018).

Dos 20 motivos apresentados pela ORF, 9 são compartilhados com ZapB de *E. coli* (ZapB, YabB, TBPIP, IncA, Sec34, APG6, bZIP_2, DUF3450 e DivIC). Ainda dos 20 totais, 9 tem atuação em procariotos (ZapB, T3SSipB, LPP20, DUF3450, DUF2947, DUF2203, YabB,

DivIC e IncA). Dentre eles, sabe-se que YabB e DivIC estão envolvidos no controle de iniciação da replicação cromossômica e formação de septo de esporulação em *B. subtilis*, respectivamente (CHO; OGASAWARA; ISHIKAWA, 2008; LEVIN; LOSICK, 1994). Diversos estudos com ZapB de *E. coli* relataram sua atuação na região do término de segregação através da interação com MatP (LIOY et al., 2018; MÄNNIK, et al., 2016; MESSERSCHMIDT; WALDMINGHAUS, 2014; SÁNCHEZ-GOROSTIAGA et al., 2016). Portanto, é provável que essa proteína em *Xac* também possa assumir papel na comunicação entre o septo de divisão e coordenação da segregação.

5.6 Análise geral dos resultados

Neste estudo, iniciamos a caracterização funcional do produto da ORF XAC3407 de *Xac* que codifica para homólogo de ZapB de *E. coli*. XAC3407 foi identificada por sua interação com a proteína ZapA de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em experimentos de duplo híbrido realizados por nosso grupo. Resultados de buscas *in silico* realizadas com o programa STRING apresentaram suporte aos nossos experimentos, onde XAC3407 e ZapA de *Xac* são exibidas como possíveis interactantes. A interação de ZapA com ZapB de *E. coli*, apontada em diversos estudos (BISICCHIA, 2013; BUSS, 2013; EBERSBACH et al, 2008; GALLI; GERDES, 2010; GALLI; GERDES, 2012), nos motivou a testar a possibilidade de XAC3407 ser um homólogo de ZapB em *Xac*, participando, portanto, do processo de divisão. Nas análises de bioinformática, vimos que a ORF XAC3407 tem alta similaridade e também identidade com proteínas de outros organismos próximos anotadas como ZapB. Apesar disso, em alinhamento proteína-proteína com ZapB de *E. coli*, ela apresenta baixa similaridade. Porém, vimos que elas apresentam o mesmo padrão sub-celular, localizando-se no centro da célula durante a divisão, possuem estruturas protéicas aparentemente similares e compartilham diversos motivos, além de ambas interagirem com proteínas ZapA.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado na localização sub-celular de XAC3407, sua interação com ZapA em experimento de duplo híbrido e nas análises de bioinformática, acreditamos que essa ORF (XAC3407) seja o homólogo de ZapB de *E. coli* em *Xac*. Estudos adicionais de deleção e interação com essa ORF podem nos ajudar a entender mais do seu funcionamento em *Xac*.

REFERÊNCIAS

- ALEGRIA, M. C. et al. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 186, n. 18, p. 6186-6197, 2004.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- BATEMAN, A. et al. UniProt: The universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 45, n. D1, p. D158-D169, 2017.
- BEHLAU, F. et al. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 311-317, 2007.
- BEHLAU, F. et al. **Cancro cítrico**: medidas essenciais de controle, 2017. 3. ed. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual/manual-cancro-citrico/52#page/1>>. Acesso em: 06 jan 2018.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. D1, p. 36-42, 2013.
- BERNHARDT, T. G.; DE BOER, P. A. J. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. **Molecular cell**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 555-564, 2005.
- BERTONI, M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O biológico**, São Paulo, v. 23, n. 10, 1957.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.
- BUSS, J. **Bacterial cell division in-sight**: a super-resolution study of the *Escherichia coli* divisome. 2013. 254 f. Tese (Doutorado) – Johns Hopkins University, Baltimore, 2014.
- CAVALCA, L. B. **Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seu potencial no controle do cancro cítrico**. 2018. 66 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2018.
- CHAGAS, M. et al. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.
- CHO, E.; OGASAWARA, N.; ISHIKAWA, S. The functional analysis of YabA, which interacts with DnaA and regulates initiation of chromosome replication in *Bacillus subtilis*. **Genes & genetic systems**, Shizuoka, v. 83, n. 2, p. 111-125, 2008.
- DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, n. 6887, p. 459, 2002.
- DAS, A. K. Citrus canker-A review. **Journal of Applied Horticulture**, New Delhi, v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.
- DE BOER, P. A. J. CROSSLEY, R. E.; ROTHFIELD, L. I. 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**, Cambridge, v. 56, n. 4, p. 641-649, 1989.
- DURAND-HEREDIA, J. M. et al. Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 193, n. 6, p. 1405-1413, 2011.

DURAND-HEREDIA, J. et al. Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, Washington, p. JB. 00176-12, 2012.

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

ERICKSON, H. P.; ANDERSON, D. E.; OSAWA, M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 74, n. 4, p. 504-528, 2010.

ESPÉLI, O. et al. A MatP–divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. **The EMBO journal**, Oxford, v. 31, n. 14, p. 3198-3211, 2012.

FINN, R. D. et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 45, n. D1, p. D190-D199, 2016a.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016b.

GALLI, E.; GERDES, K. Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. **Molecular microbiology**, Salem, v. 76, n. 6, p. 1514-1526, 2010.

GALLI, E.; GERDES, K. FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 194, n. 2, p. 292-302, 2012.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, James H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, St. Paul, v. 10, p. 32, 2002.

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

GTACC - Grupo Técnico de Assistência e Consultoria Em Citrus. Estimativa GTACC de produção de laranja, safra 2018/2019. **Boletim informativo**, nº1, maio 2018. Disponível em: <<http://www.gtacc.com.br/revista/boletim/estimativa-gtacc-de-producao-de-laranja-safra-2018-2019>>. Acesso em: 15 set. 2018.

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

IBGE, I. B. DE G. E E. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. 2016. **Estatística da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 12, p. 1–82, 2017.

LACERDA, L. A. et al. Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid**, New York, v. 90, p. 44-52, 2017.

LEONARD, T. A.; MØLLER-JENSEN, J.; LÖWE, J. Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 360, n. 1455, p. 523-535, 2005.

LEVIN, P. A.; LOSICK, R. Characterization of a cell division gene from *Bacillus subtilis* that is required for vegetative and sporulation septum formation. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 176, n. 5, p. 1451-1459, 1994.

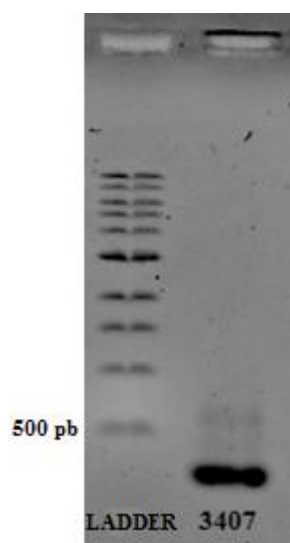
LIOY, V. S. et al. Multiscale Structuring of the *E. coli* Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. **Cell**, Cambridge, v. 172, n. 4, p. 771-783. e18, 2018.

LOCK, R. L.; HARRY, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 7, n. 4, p. 324, 2008.

- LORENZONI, A. S. G. et al. *Xanthomonas citri* MinC oscillates from pole to pole to ensure proper cell division and shape. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1352, 2017.
- LUTKENHAUS, J. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 76, p. 539-562, 2007.
- MANIATIS, T. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold spring harbor laboratory, 1982.
- MÄNNIK, J. et al. The role of MatP, ZapA and ZapB in chromosomal organization and dynamics in *Escherichia coli*. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 1216-1226, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Resolução SAA - 5, de 02-02-2018a**. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-5-de-02-02-2018,1147.html>>. Acesso em: 20/09/2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 21, de 25 de abril de 2018b**. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_27646168_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_21_DE_25_DE_ABRIL_DE_2018.aspx>. Acesso em: 12 set. 2018.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 45, n. D1, p. D200–D203, 2017.
- MARTEYN, B. S. et al. ZapE is a novel cell division protein interacting with FtsZ and modulating the Z-ring dynamics. **mBio**, Washington, v. 5, n. 2, p. e00022-14, 2014.
- MARTINS, P. M. M.; FERREIRA, H. **Localização sub-celular de proteínas marcadas com GFP em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* por microscopia de fluorescência**. Tese (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 2009.
- MARTINS, P. M.M. et al. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 310, n. 1, p. 76-83, 2010.
- MATTOS JUNIOR, D. de et al. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. **Instituto Agrônômico**, Cordeirópolis, v. 26, 2005.
- MESSERSCHMIDT, S. J.; WALDMINGHAUS, T. Dynamic organization: chromosome domains in *Escherichia coli*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, Basel, v. 24, n. 5-6, p. 301-315, 2014.
- NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: CitrusBR, 2010.
- OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.
- RICE, P.; LONGDEN, L.; BLEASBY, A. EMBOSS: The european molecular biology open software suite. **Trends in Genetics**, London, v. 16, n. 6, p. 276–277, 2000.
- SÁNCHEZ-GOROSTIAGA, A. et al. Life without Division: Physiology of *Escherichia coli* FtsZ-Deprived Filaments. **mBio**, Washington, v. 7, n. 5, p. e01620-16, 2016.
- SCHUBERT, T. S. et al. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. **Plant disease**, St. Paul, v. 85, n. 4, p. 340-356, 2001.
- THOMAIDES, H. B. et al. Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. **Genes & development**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 13, p. 1662-1673, 2001.
- VON MERING, C. et al. STRING: A database of predicted functional associations between proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 258–261, 2003.

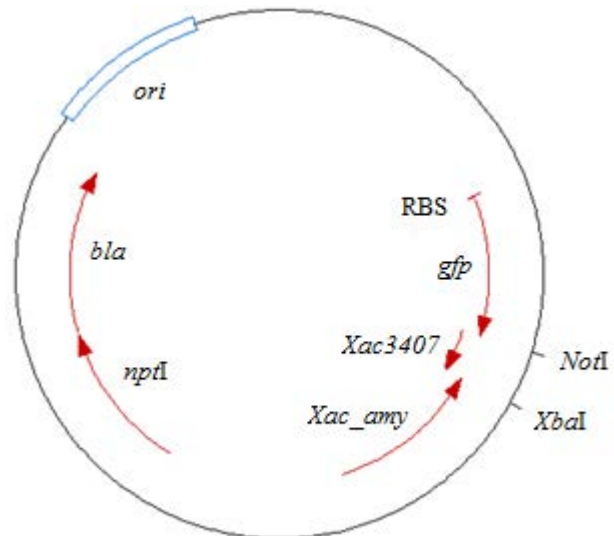
WU, L. J.; ERRINGTON, J. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. **Cell**, Cambridge, v. 117, n. 7, p. 915-925, 2004.

APÊNDICE A: Gel de agarose 0,07% com fragmento de XAC3407 (222 pb) amplificado por PCR.



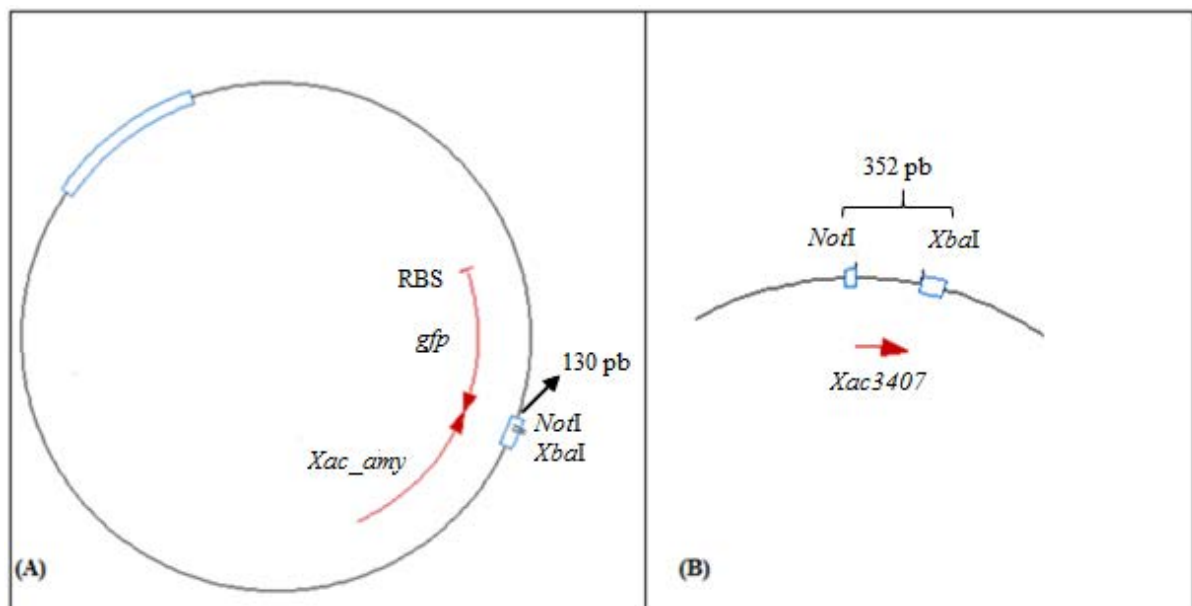
Fonte: Próprio autor (2018).

ANEXO A – Mapa do plasmídeo pBCS1



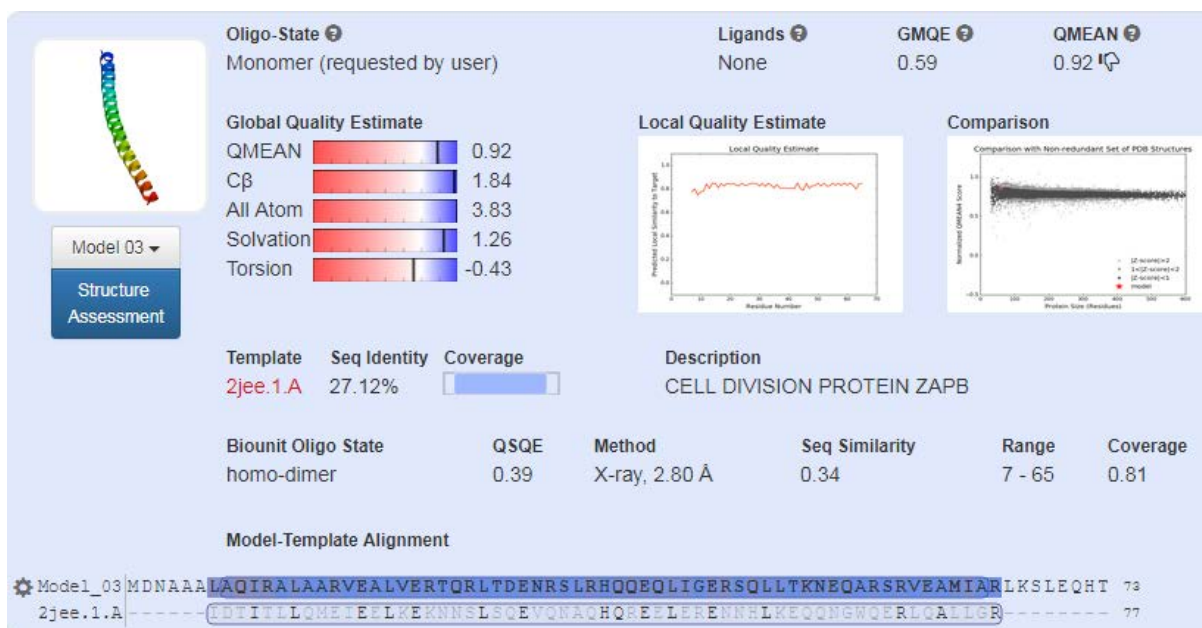
Fonte: Adaptado de Clone Manager (2018).

ANEXO B - Mapa do plasmídeo pGCD21 apontando região amplificada no vetor com os primers GFP F e amy R (A) e região amplificada com XAC3407 inserida no vetor (B).



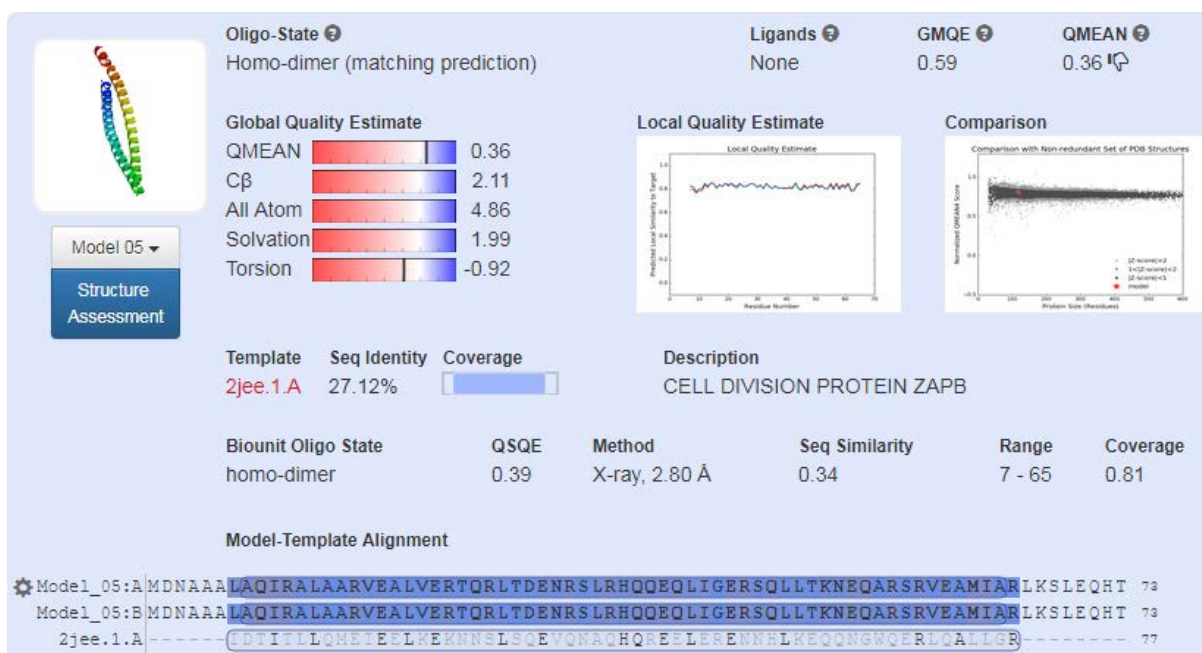
Fonte: Adaptado de software Clone Manager (2018).

ANEXO C – Parâmetros de modelagem do monômero de XAC3407.



Fonte: Adaptado do SWISS-MODEL (2018).

ANEXO D – Parâmetros de modelagem do dímero de XAC3407.



Fonte: Adaptado do SWISS-MODEL (2018).