

LILIAN AMARAL LACERDA

SISTEMA PARA DEPLEÇÃO DE PROTEÍNAS EM
Xanthomonas citri* subsp. *citri

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro

2015

Dedico

Aos meus pais , José e Sueli,

Pelos mais valiosos ensinamentos, pela confiança e respeito pelas minhas escolhas.

Ao meu esposo, André,

Pelo apoio constante e abdicação para que eu pudesse trilhar esse caminho.

Aos meus irmãos, Adriana, Luciana e Wellington,

Mesmo à distância, me incentivaram a prosseguir.

AGRADECIMENTOS

À Deus: “O Senhor fez em mim maravilhas” (Ic 1,46-55).

Agradeço ao Dr. Henrique Ferreira, pela rica orientação, pela paciência, pela oportunidade de ingressar na área da pesquisa científica, pelos valiosos diálogos e correções construtivas que me ajudaram a concluir este trabalho, enfim, pela confiança e amizade.

À Dra. Paula Maria Moreira Martins do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Cordeirópolis – SP, pela valiosa ajuda com diversos experimentos, bem como, pela disponibilidade, atenção e por ter compartilhado o seu conhecimento em ocasiões diversas.

À Dra. Isabel Cristiane da Silva, pela receptividade em Araraquara e pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.

À Juliana, Pedro, Rubens e Márcio do Departamento de Bioquímica e Microbiologia pela cumplicidade e incentivos.

Aos colegas do Laboratório Genética de Bactérias e demais laboratórios do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, (Luana, Fernanda, Danilo, Amanda, Giordanni e Abigail) pela companhia, incentivo, ajuda nas diversas etapas deste trabalho e pelos momentos de descontração.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e ao Laboratório Genética de Bactérias, onde esta pesquisa foi desenvolvida.

Aos Técnicos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia em especial ao Técnico Adriano Uemura de Faria, pela solicitude e amizade.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) e ao Prof. Maurício Bacci Jr que cedeu espaço físico e acesso ao uso de equipamentos no Laboratório.

Ao Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pelas análises de citometria de fluxo.

Ao André, meu esposo, companheiro e pilar, pela dedicação incondicional, por entender minhas ausências e por durante todo esse tempo ter abdicado de seus planos para que eu pudesse realizar os meus.

Aos meus pais, que me deram os mais valiosos ensinamentos, pela amizade e pelas orações.

À “Dona Cida” e “Dona Inês” pelo acolhimento em Rio Claro e pelos saborosos lanchinhos que recebi!!!

Aos meus amigos, Natalí Graciane, Camila Fagionatto, Beatriz de Macedo Zero, Paulo Monelli, Arnaldo Ribeiro, Valdir da Silva, Fernando Parreira e Baltazar de Paula, pelo apoio e palavras de incentivo que me ajudaram durante este trabalho.

“Tudo tem um propósito até as máquinas. Os relógios dizem as horas, os trens levam a lugares... Por isso as máquinas quebradas me deixam triste, não servem aos seus propósitos. Talvez seja assim com as pessoas. Perder o nosso propósito é como estar quebrado... Imaginava que o mundo inteiro era uma grande máquina. As máquinas nunca vêm com peças sobressalentes, vêm sempre com a quantidade certa que precisam. Então entendi que se o mundo fosse uma grande máquina, eu não poderia ser uma peça sobressalente. Eu tinha que estar aqui por alguma razão...”

- Hugo Cabret -

(SELZNICK, B., 2007)

RESUMO

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xac) é o agente causal do cancro cítrico, uma das doenças mais graves que afetam plantas cítricas de importância comercial em todo o mundo. O controle eficaz para o cancro cítrico constitui na eliminação de plantas infectadas em programas rigorosos para conter a propagação da bactéria. No entanto, o relaxamento recente nas políticas para combater cancro cítrico em áreas como o estado de São Paulo - Brasil, está a contribuir para a propagação da doença. O conhecimento da biologia deste patógeno de plantas e também dos mecanismos envolvidos na interação planta-patógeno são de grande importância para apoiar o desenvolvimento de estratégias para lidar com o cancro cítrico. Um trabalho recente de nosso grupo demonstrou que os mutantes *X. citri* com disrupção do gene *parB* são comprometidos na segregação cromossômica e na capacidade de produzir os sintomas da doença na planta. No presente trabalho, nós estendemos nossas caracterizações, avaliando os efeitos da falta de *parB* em mutantes *X. citri* através de uma deleção limpa. ParB é uma proteína de ligação ao DNA e está envolvida no processo de segregação cromossômica através de interação com outras proteínas. Devido à dificuldade de deleção de genes envolvidos neste processo em *X. citri*, o nocaute de *parB* foi realizado numa variante abrigando um plasmídeo replicativo capaz de expressar cópias extras de ParB (ParB-TAP) sob o controle de *para* (promotor de arabinose). A viabilidade de *X. citri parB* nocaute (*XacΔparB*-pLAC2) foi avaliada em experimentos de curva de crescimento e em comparação com a estirpe do tipo selvagem, em condições de repressão ou de indução de *parB-tap* ligado a este promotor; O objetivo foi explorar as condições de depleção e superexpressão de ParB e seus efeitos através da caracterização do referido promotor. Em seguida, *X. citri parB* nocaute foi visualizado por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), afim de que fossem observadas possíveis alterações morfológicas, que indicassem falhas no processo de segregação cromossômica. Nossos resultados mostraram que *para* é responsivo e bem regulado em *X. citri* e que a falta ou superexpressão de ParB, promoveu alterações fenotípicas sutis, porém significativas, representadas por aumento em uma ordem de magnitude no número de células anucleadas. Tais alterações, entretanto, não foram letais para *X. citri*.

Palavras-chave: Promotor de arabinose. Gene *parB*. Segregação cromossômica. Cancro cítrico.

ABSTRACT

Xanthomonas citri ssp. *citri* (Xac) is the causal agent of citrus canker, one of the most severe diseases that affect citrus plants of commercial importance around the world. An effective control for citrus canker constitutes the elimination of infected plants in rigorous programs to contain the spread of the bacteria. However, recent relaxation in the policies to combat citrus canker in areas such as the state of São Paulo, Brazil, the major orange juice producer in the world, are contributing to the spread of the disease. Therefore, knowledge of the biology of this plant pathogen and also of the mechanisms involved in plant-pathogen interaction are of great importance to support the development of strategies to deal with citrus canker. Recent work from our group demonstrated that *X. citri* mutants disrupted for *parB* are compromised in chromosome segregation and are unable to produce disease symptoms in plant. In the present work, we extended our characterizations by evaluating the effects of a lack of ParB in *X. citri* mutants carrying a clean deletion of its coding DNA. ParB is a DNA binding protein and is involved in chromosome segregation process through interaction with other proteins. Because of difficult in genes deletion involved this process in *X. citri*, the *parB* gene was deleted in a *X. citri* variant harboring a replicative plasmid able to express extra copies of ParB (ParB-TAP) under the control of the *para* (arabinose promoter). The viability of the *X. citri parB* knockout was assessed in growth curve experiments and compared with the wild type strain under different conditions of *parB-tap* repression or induction. The aim was to explore the conditions depletion and overexpression of ParB and its effects through the characterization of *para* in *X. citri*. Thus, the *X. citri parB* knockout was visualized under differential interference contrast (DIC) microscopy in order to detect morphological alterations normally expected from bacterial cells perturbed for their functions of chromosome organization. The results showed that the *para* is responsive and well regulated in *X. citri* and the ParB lack or overexpression caused phenotypic changes subtle but significant. However, such changes were not lethal to *X. citri*.

Keywords: Arabinose promoter. *parB* gene. Chromosome segregation. Citrus canker.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

DAPI - 2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamidina

DIC - Contraste de interferência diferencial

DNA - Ácido desoxirribonucleico

D.O. - Densidade óptica

Fundecitrus - Fundo de defesa da citricultura

kb - Kilo base

kDa - Kilo Dalton

kV - quilovolt

LB - Meio Luria-Bertani

mg/mL - Miligramas por mililitro

ms - Milissegundos

nm - Nanômetros

nM - Nanomolar

NYG - Meio *Nutrient Yeast Glycerol*

ORF - Open reading frame

oriC - Origem de replicação

para - Promotor de arabinose

pb - pares de base

pBAD - promotor de *ara B*, *araA* e *araD* (genes)

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PVDF - Membrana de *Polyvinylidene difluoride*

°C - Graus Célsius

RNA - Ácido ribonucleico

Rpm - Rotações por minuto

SDS -Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato

subsp. - subspécie

wt - wild type

Xac - *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

µm - Micrometros

µg/mL - Microgramas por mililitro

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 A citricultura e o cancro cítrico	11
1.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	13
1.3 Sistema de partição cromossômica tipo ParAB/ <i>parS</i>	14
1.4 O sistema de arabinose como ferramenta na regulação da expressão gênica.....	16
2 SIGNIFICÂNCIA E RELEVÂNCIA DA PROPOSTA	19
3 OBJETIVO GERAL	19
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5 MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Biologia Molecular	20
5.2 Linhagens bacterianas, plasmídeos e primers	20
5.3 Construindo um sistema de expressão de proteínas baseado em promotor de arabinose para <i>X. citri</i>	21
5.4 Sequenciamento de DNA.....	22
5.5 Amplificação para clonagem e diagnóstico.....	22
5.6 Eletrotransformação	23
5.7 Deleção de <i>parB</i> em <i>X. citri</i>	23
5.8 Curva de crescimento	24
5.9 Expressão de proteínas.....	25
5.10 SDS-PAGE e Western Blotting	25
5.11 Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI	26
5.12 Análise estatística	26
5.13 Testes de patogenicidade.....	26
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1 Viabilidade dos transformantes Xac-pLAC1 e Xac-pLAC2	28
6.2 Funcionalidade do promotor de arabinose em <i>X. citri</i>	29
6.3 Deleção de <i>parB</i> em Xac-pLAC2	30
6.4 Depleção e Indução de ParB – Curva de crescimento.....	33
6.5 Fenótipos da complementação de ParB em <i>X. citri</i>	36
6.6 Fenótipos da depleção de ParB em <i>X. citri</i>	38
6.7 Fenótipos da superexpressão de ParB em <i>X. citri</i>	41
6.8 Teste de patogenicidade	46
7 CONCLUSÕES.....	48
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Lesões de cancro cítrico causadas por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	12
Figura 2: Modelo de segregação cromossômica proposto para <i>C. crescentus</i>	16
Figura 3: Sistema liga e desliga do promotor de arabinose de <i>E. coli</i>	17
Figura 4: Mapa dos vetores de expressão pLAC1 e pLAC2.	22
Figura 5: Curva de crescimento de <i>X. citri</i> wt, <i>Xac</i> -pLAC1 e <i>Xac</i> -pLAC2.....	29
Figura 6: Western Blotting para detectar ParB-TAP nos extratos proteicos da linhagem <i>Xac</i> -pLAC2.....	30
Figura 7: PCR diagnóstico para presença de parB em <i>Xac</i> -pLAC2 (para-parB-tap1479).	32
Figura 8: PCR diagnóstico para detecção de parB em pLAC2 (para-parB-tap1479).	32
Figura 9: Curva de crescimento de <i>X. citri</i> wt e <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 com detecção de ParB-TAP por Western Blotting	35
Figura 10: Detecção de ParB-TAP por Western Blotting.....	35
Figura 11: Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI de <i>Xac</i> wt e <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 (C) na condição de expressão basal de parB-tap.	37
Figura 12: : Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI de <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 (C) na condição de expressão basal de parB-tap e <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 (G) na condição de depleção de ParB-TAP.	40
Figura 13: Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) de <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 na condição de ausência de ParB-TAP.....	41
Figura 14: Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI de <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 (C) na condição de expressão basal de parB-tap e <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 (A) na condição de superexpressão de parB-tap.	42
Figura 15: Curva de crescimento de <i>X. citri</i> wt, <i>Xac</i> -pLAL e <i>Xac</i> ΔparB-pLAC2 com indução por arabinose 0,05%.....	44
Figura 16: Teste de patogenicidade após 40 dias.	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 A citricultura e o cancro cítrico

A citricultura no Brasil ocupa uma área de mais de 800 mil ha, destacando-se nas regiões de São Paulo e Triângulo Mineiro que detêm mais de 80% da produção de laranjas. Originária do sul asiático e introduzida no Brasil em meados de 1500, a laranja teve excelente adaptação em todos os Estados Brasileiros (NEVES et al., 2010). O Brasil mantém a liderança mundial na produção de laranjas e em tecnologia de citros, sendo responsável por mais de 50% da produção de sucos e exporta 98% desta produção, principalmente para a Europa e Estados Unidos, movimentando um mercado de trabalho anual em cerca de 600 milhões de dólares. (NEVES et al., 2010).

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 e KIMPE, 2001).

Dentre as principais ameaças à citricultura brasileira está o cancro cítrico, uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri*, constatada pela primeira vez em 1957 na região de Presidente Prudente (BITANCOURT, 1957).

Os sintomas do cancro cítrico ou cancrose do tipo A 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 da umidade do ar 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 (GOTTWALD et al., 2002; GALLI, 1980). 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).

Os sintomas do cancro cítrico são agravados pela presença da larva minadora-de-citros *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), pois este causa ferimentos no mesófilo foliar que facilitam a penetração da bactéria aumentando a disseminação da doença (CHAGAS et al., 2001). A presença da larva foi constatada primeiramente em março de 1996 na região de Limeira (SP), e teve uma rápida disseminação pelo país (CHAGAS et al., 2001). Finalmente, a multiplicação da bactéria nas lesões em expansão também está relacionada, entre outros, com a susceptibilidade da planta hospedeira, condições microclimáticas e quantidade do inóculo.

Além dos danos relacionados à qualidade e quantidade de frutas, a doença também resulta em impactos socioeconômicos e políticos graves por conta dos padrões de mercado para importação de frutos cítricos, que tem sua comercialização regulamentada por legislação internacional, pois o cancro cítrico é considerado uma “praga quarentenária” (FUNDECITRUS, 2015b; GOTTWALD et al., 2002).

Evitar o cultivo de citros em áreas com condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença, bem como, adotar medidas de inspeção relacionadas à sanidade da atividade agrícola, são alguns exemplos de medidas de prevenção e controle que são recomendados em áreas de endemismo (GALLI, 1980), entretanto, a erradicação de árvores sintomáticas e árvores vizinhas num raio de 30m continua sendo a medida mais eficaz contra a propagação do cancro cítrico (FUNDECITRUS, 2009).

Após alterações nos critérios relacionados à erradicação do cancro cítrico pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA/SP) em julho de 2009, houve uma queda no alto nível de sanidade dos pomares, conquistado através da legislação adotada entre 1999 a 2009, que determinava a erradicação de plantas de um talhão quando a incidência de plantas sintomáticas fosse $> 0,5\%$ (BELASQUE Jr. et al., 2010). Mais recentemente (Resolução SAA - 147, de 31-10-2013), houve nova alteração de legislação, onde 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-se a adotar eliminação da planta contaminada e pulverização com cobre das plantas no raio de 30 metros.

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 (GALLI, 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 canrose 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 (GUZZO et al., 2013; HUANG et al., 2013; KRAISELBURD et al., 2012; LI e WANG, 2012; MALAMUD et al., 2012; SGRO et al., 2012; YAN et al., 2012). 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 (LAIA et al., 2009; YAN e WANG, 2012).

1.3 Sistema de partição cromossômica tipo ParAB/*parS*.

Proteínas envolvidas no sistema de partição cromossômica tipo ParAB/*parS* são encontradas na maioria dos genomas bacterianos sequenciados, as exceções são *Enterobacteriaceae* e *Pasteurellaceae*. (LIVNY et al., 2007).

O sistema de partição cromossômica tipo ParAB/*parS* compreende uma sequência no DNA chamada *parS*, e dois genes, *parA* e *parB* que codificam respectivamente proteínas com atividade de ATPase e de ligação ao DNA, ambas envolvidas na segregação cromossômica. Inicialmente foi estudado em plasmídeos de baixo número de cópias, onde reconhecidamente mostrou estar envolvido nesse processo de partição e na manutenção da estabilidade de cópias para células filhas durante a divisão celular (BIGNELL e THOMAS, 2001; MIERZEWSKA e BURDZY, 2012).

Posteriormente, a caracterização deste sistema começou a ser bem elucidada em micro-organismos, como *Bacillus subtilis* e *Caulobacter crescentus*, sendo que para este último, sua atividade mostrou ser essencial na segregação cromossômica (MOHL e GOBER, 1997).

Por ser uma região conservada em um grande número de bactérias que utilizam o sistema de partição cromossômica tipo ParAB/*parS*, a sequência denominada *parS* pode ter surgido no início da evolução dos cromossomos bacterianos. Sua localização é identificada próxima às regiões de origem dos cromossomos, *oriC* que é reconhecida por ParB formando um complexo ativo no processo de segregação cromossômica (LIVNY, 2007;

MIERZEWSKA e BURDZY, 2012). Sequências *parS* podem ocorrer, entretanto, em regiões distantes de *oriC*, cuja função biológica ainda não é bem compreendida (MIERZEWSKA e BURDZY, 2011).

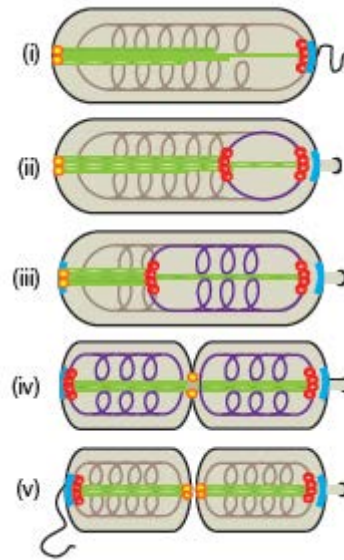
A caracterização funcional desse sistema em *C. crescentus* demonstrou que o complexo formado por ParB/*parS* (centrômero bacteriano) interage com filamentos formados pela proteína ParA e que ficam ancorados aos pólos bacterianos (PTACIN et al., 2010). Observe esta interação na figura 2 onde ParB estimula a atividade ATPasica de ParA em uma das extremidades do filamento, que ao sofrer despolimerização, conduz a origem recém replicada para o pólo oposto da célula (PTACIN et al., 2010). O correto funcionamento deste complexo de partição cromossômica em *C. crescentus* atua também no posicionamento do septo de divisão celular via interação com o inibidor de FtsZ conhecido como MipZ (THANBICHLER e SHAPIRO, 2006).

Em *X. citri*, a atividade desse sistema de partição está em caracterização. Uma única região *parS* foi identificada por Livny et al. (2007), (TGTTCCACGTGGAACG; coordenadas genômicas c2753..2768) e um pequeno operon (*parAB*), que contém as ORFs XAC3905 (tipo *parA*) e XAC 3906 (homólogo *parB*), foi descrito por Silva e colaboradores em 2002.

Partindo desses dados, Ucci et al. (2014) mostraram evidências da funcionalidade do sistema de partição ParAB/*parS* em *X. citri* ao demonstrar a atividade do operon *parAB* através da expressão estável de ParB nesta bactéria e também através do padrão de localização subcelular de ParB-GFP, que indica sua ligação às regiões de origem no cromossomo sendo guiadas aos pólos da célula para que ocorra a segregação cromossômica.

Além da segregação cromossômica, proteínas ParB parecem participar de vários outros processos celulares, como motilidade em *P. aeruginosa* (BARTOSIK et al., 2009) e *X. citri* (UCCI et al., 2014), esporulação e controle do início de replicação em *B. subtilis* (IRON et al., 1994; LEE et al., 2003), sendo que a alteração da sua função, bem como a falta ou superexpressão pode levar a efeitos pleiotrópicos como produção de células anucleadas, filamentação e baixa motilidade (BARTOSIK et al., 2009). Em *X. citri*, a disrupção de *parB* também afeta a capacidade de colonizar a planta hospedeira e induzir sintomas típicos de cancro (UCCI et al., 2014).

Figura 2: Modelo de segregação cromossômica proposto para *C. crescentus*.



i) Uma célula de *C. crescentus*. O cromossomo não replicado (círculos marrons) interage parcialmente com ParA (linha verde) e é ancorado ao polo velho da célula através do complexo ParB (círculos vermelhos) e PopZ (linha ciano). TipN (círculo amarelo) marca o novo polo da célula, ii) O complexo ParB-*parS* é liberado do polo e duplicado (linha roxa indica DNA recém-duplicado), iii) O complexo ParB-*parS* liga-se ao protofilamento formado por ParA, iv) O complexo ParB-*parS* estimula a atividade ATPásica de ParA v) O complexo ParB-*parS* é ancorado ao novo polo por PopZ, enquanto TipN é recrutada para o sítio de divisão para marcar o novo polo para o próximo ciclo (PTACIN et al., 2010).

1.4 O sistema de arabinose como ferramenta na regulação da expressão gênica.

O sistema de arabinose de *E. coli*, representa um sistema eficiente em vetores de expressão (pBAD), pois pode ser facilmente modulado para ligar e desligar genes, permitindo assim, o estudo de fenótipos de mutações nulas de genes essenciais. Comparado com vetores baseados em outros sistemas, vetores pBAD mostram uma razão de indução/repressão muito superior (GUZMAN et al., 1995).

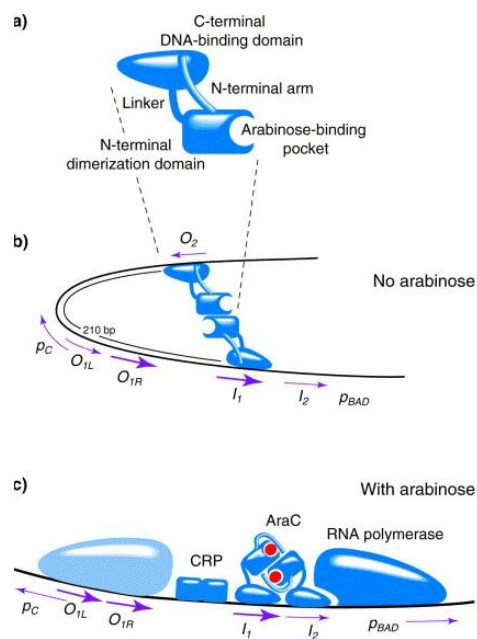
Como descrito por Sheppard e Englesberg (1967), o sistema de arabinose de *E. coli* está sob o controle positivo de uma proteína codificada pelo gene ativador *araC*, que atua como um sensor da presença de arabinose, regulando sua própria síntese e a expressão de outros outros genes (*araB*, *araA* e *araD*), que codificam para as enzimas envolvidas no metabolismo de L-arabinose (SCHILEIF et al., 2000). O controle negativo reflete uma

atividade secundária de AraC, que atua reprimindo o promotor na ausência de arabinose e presença de glicose.

Na ausência de arabinose (Figura 3a,b), o braço N-terminal de AraC interage com os domínios de ligação ao DNA, adquirindo uma conformação que promove um *loop* da sequência *araO₂*, a montante do promotor, para se ligar à sequência *araI₁*; Esta estrutura impede o reconhecimento pela unidade σ da RNA polimerase, reprimindo dessa forma o promotor.

Na presença de arabinose (Figura 3c), interações entre arabinose e os braços N-terminal de AraC mantêm os domínios de ligação ao DNA livres para se ligarem à *I₁* e *I₂*, o que leva à indução do promotor (SCHILEIF et al., 2000).

Figura 3: Sistema liga e desliga do promotor de arabinose de *E. coli*.



A) Proteína AraC com seus braços N-terminal e o domínio de ligação ao DNA, B) conformação de AraC na ausência de arabinose promove um *loop* da sequência *araO₂*, C) Indução do promotor na presença de arabinose (SCHILEIF, 2000).

Sistemas de expressão de proteínas baseados no promotor de arabinose já foram testados com relativo sucesso em membros do gênero *Xanthomonas*, incluindo *X. citri* (SUKCHAWALIT et al., 1999; YANG et al., 2009; DUNGER et al., 2007). Condições ótimas para indução são bem estabelecidas (GUZMAN et al., 1995; SUKCHAWALIT et al., 1999) entretanto, com relação às condições de repressão, carecemos de uma caracterização detalhada da funcionalidade deste promotor em *Xac*, e que possa nos fornecer informações quanto à possibilidade do seu uso em estudos de complementação gênica e depleção de produtos gênicos suspeitos de serem essenciais.

2 SIGNIFICÂNCIA E RELEVÂNCIA DA PROPOSTA

O agente causal do cancro cítrico, *X. citri*, é responsável por perdas econômicas consideráveis para a citricultura (GOTTWALD et al., 2002). Esta bactéria teve seu genoma sequenciado e anotado há mais de uma década (DA SILVA et al., 2002) e ainda, pouco se sabe sobre sua biologia. Ferramentas para sua manipulação são adaptações de metodologias empregadas para outras espécies e gêneros bacterianos. Na busca por uma melhor caracterização deste fitopatógeno, nosso grupo tem buscado não só o desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética específicas para *X. citri* (MARTINS et al., 2010), como agora buscamos padronizar um sistema de deleção/complementação de genes suspeitos de serem essenciais para nosso modelo biológico. Nossa proposta foi prosseguir com a caracterização funcional da proteína de segregação cromossômica ParB, através deste sistema, explorando as condições de depleção e superexpressão de ParB e seus efeitos em *X. citri*.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia eficiente para o estudo de ORFs/genes essenciais em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a funcionalidade e controle do promotor de arabinose em *X. citri* em um sistema de complementação gênica com base em vetor replicativo;

Utilizar o vetor supracitado em programa de deleção de genes considerados essenciais. Ampliar a caracterização funcional de ParB nesta bactéria;

Averiguar se a presença do sistema de expressão supracitado altera a virulência de *X. citri*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 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 #K0502, #K0503 e Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit # K0691. As reações enzimáticas de digestão, ligação e amplificação por PCR seguiram as instruções do fabricante das enzimas utilizadas (Neb e Fermentas-Thermo).

5.2 Linhagens bacterianas, plasmídeos e primers

A linhagem *X. citri* 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) utilizada no presente estudo foi a sequenciada por (DA SILVA, et al., 2002). *E. coli* DH5 α (*F* ϕ 80*dlacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*)*U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺ phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1)*) e DH10B (*F* *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74 recA1 endA1 ara* Δ *139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ - *rpsL* (*Str^R*) *nupG*) foram utilizadas para as clonagens. *Xac* foi cultivada a 29° C em meio NYG com ou sem ágar (DANIELS et al., 1984) ou em meio mínimo com e sem ágar (SAMBROOK et al., 1989). Linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB a 30 ou 37 °C, acrescido ou não de ágar (SAMBROOK et al., 1989). Os antibióticos ampicilina, gentamicina e canamicina, na concentração de 20 μ g/ml, foram utilizados na preparação de pré-inóculos e reativação das bactérias, quando necessário.

O promotor de arabinose (*para*), juntamente com a sequência que codifica para a proteína carreadora acyl de *E. coli* mais um fragmento codificando para o peptídeo TAP (PUIG et al., 2001), foram amplificados por PCR a partir do vetor pEB304, gentilmente cedido por E. Bouveret (GULLY et al., 2003), com primers pARAF2 e pARAR2. O produto de PCR (2,1Kb) foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III (Fermentas) e posteriormente usado para ligação ao vetor replicativo pBBR1, linearizado com as enzimas de restrição *Hind*III e *Sma*I (Fermentas).

Essa reação de ligação originou o vetor pLAL1, que foi digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Eco*RI (perde *acp-tap*) e usado em duas reações de ligação: Uma ligação

com o produto de PCR *parB-tap* amplificado do vetor pAPU1 (UCCI et al., 2014) com primers ParBF_20140220 e TAP_1479_20140220 digeridos com as mesmas enzimas, originando o vetor pLAC2. Outra ligação com o produto de PCR *parB* amplificado do vetor pAPU1 com primers ParBF_20140220 e ParBR_20140220 também digeridos com as mesmas enzimas, originando o vetor pLAC1.

Os vetores pLAC1 e pLAC2 foram introduzidos por eletrotransformação em *Xac* wt originando as linhagens *Xac*-pLAC1 e *Xac*-pLAC2. Esta última usada posteriormente em experimentos de Western Blotting para testar a funcionalidade do promotor *ara*, avaliando a expressão de ParB-TAP.

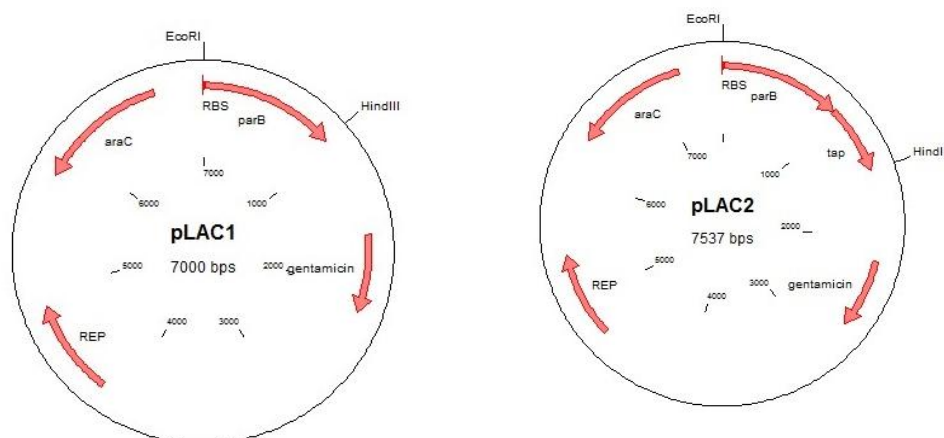
O vetor suicida pNPTS Δ *parB* (UCCI et al., 2014) foi utilizado para deleção de *parB* cromossômico de *Xac*-pLAC1 e *Xac*-pLAC2, originando as linhagens *Xac* Δ *parB*-pLAC1 e *Xac* Δ *parB*-pLAC2.

5.3 Construindo um sistema de expressão de proteínas baseado em promotor de arabinose para *X. citri*

Os vetores pLAC1 e pLAC2 (Figura 4) foram construídos com o intuito de estudarmos a funcionalidade do promotor de arabinose (*para*) derivado do sistema pBAD (GUZMAN et al., 1995), como ferramenta na regulação da expressão de genes suspeitos de serem essenciais em *Xac*. Além do promotor referido, tais vetores possuem as sequências *parB* e *parB-tap* ligadas a 3' do *para* em pLAC1 e pLAC2, respectivamente.

A finalidade do peptídeo TAP em fusão com *parB* no vetor pLAC2 é tornar possível a detecção da proteína ParB em experimentos de western sem a necessidade de anticorpo específico anti-ParB, pois TAP possui afinidade por regiões conservadas de imunoglobulinas (especialmente de coelho).

Figura 4: Mapa dos vetores de expressão pLAC1 e pLAC2.



ORFs/genes encontram-se esquematizados proporcionalmente ao tamanho do vetor; Sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *HindIII* delimitam as sequências *parB* em pLAC1 e *parB-tap* em pLAC2.

5.4 Sequenciamento de DNA.

O sequenciamento das ORFs foi realizado pela *MacroGen Corporation* (www.macrogen.com).

5.5 Amplificação para clonagem e diagnóstico.

Para a amplificação das sequências foram usados DNA plasmidial (5 nanogramas) ou DNA genômico (1µg), tampão da enzima *Pfu* DNA polimerase para 1X final (Fermentas, 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 *ara* foi “touch down” : desnaturação inicial a 94 °C/4’30’’, seguido de 3 ciclos de 94 °C/30’’, A °C/30’’, 70 °C/4’30’’ (A= 68 °C a 64 °C; diminuição de dois graus a cada ciclo num total de 3 ciclos). Finalmente, foram realizados mais 30 ciclos de 94 °C/30’’, 62 °C/30’’ e 70 °C/4’30’’.

Para amplificação de *parB-tap* e *parB* (sequências 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’’, A °C/30’’, 70 °C/2’ (A= 72 °C a 66 °C; diminuição de dois graus a cada ciclo num

total de 4 ciclos). Finalmente, foram realizados mais 30 ciclos de 94 °C/30'', 60 °C/30'' e 72 °C/2'.

5.6 Eletrotransformação

Para a eletrotransformação de *X. citri*, seguimos a metodologia de Ferreira et al. (1995) e de Amaral et al. (2004) com modificações.

Os vetores utilizados para a eletrotransformação foram os descritos acima (pLAC1 e pLAC2), com o propósito de fornecer à *X. citri* uma cópia extra do gene *parB* sob o comando de um promotor induzível e que possa ser facilmente regulado para modular a expressão gênica, obtendo assim as linhagens Xac-pLAC1 e Xac-pLAC2.

X. citri foi cultivada em meio NYG até D.O. ~1,0. Posteriormente foram centrifugadas a 3000xg por 10 min e lavadas por duas vezes em água destilada, autoclavada e gelada. Pellets celulares foram dissolvidos no próprio residual do sobrenadante e mantidos no banho de gelo. Eletrotransformações foram realizadas com 200 ng de DNA plasmidial em 100µl de suspensão de células de *X. citri*, submetidas a descargas elétricas de 2,4 kV por aproximadamente 5 ms, utilizando-se cubetas (BioRad) com espaçamento de 0,2 cm entre eletrodos. Em seguida, foram adicionados às cubetas 900µl de meio NYG, para suspensão das células eletroporadas. A suspensão de células foi transferida para béquers de vidro de 10 ml esterilizados e mantidos em agitação (170 rpm) a 29 °C por 2 a 4 h. Em seguida, aproximadamente 200 µl da suspensão foram espalhados em placas contendo meio NYG com antibiótico apropriado para seleção dos transformantes.

5.7 Deleção de *parB* em *X. citri*.

O vetor pNPTSΔ*parB* (A.M. UCCI e H. FERREIRA, dados não publicados), construído a partir do vetor suicida pNPTS138 (LUCY SHAPIRO, dados não publicados), possui fragmentos de 1200 pb e 1000 pb que flanqueiam *parB* cromossômico em *X. citri*; Amplificados a partir do molde DNA cromossomal de Xac (UCCI et al., 2014). Dessa forma, quando introduzido por eletrotransformação em Xac, o vetor pNPTSΔ*parB* realiza a deleção de *parB* cromossômico através de troca alélica e um duplo evento de recombinação homóloga.

Este vetor carrega uma marca de resistência à canamicina e o gene *sacB*, que codifica a enzima levansucrase que converte sacarose em um produto tóxico para gram-negativos.

Neste trabalho, Xac-pLAC1 e Xac-pLAC2 foram eletrotransformadas com ~ 200 ng do vetor suicida pNPTS Δ *parB* e os transformantes do primeiro evento de recombinação foram selecionados em meio NYG ágar com gentamicina e canamicina. Na sequência, um transformante de cada linhagem foi selecionado para crescimento durante 14 h em meio NYG líquido somente com gentamicina, para ocorrência do segundo evento de recombinação. Aliquotas dessa cultura foram espalhadas em placas de Petri contendo meio NYG (gentamicina) suplementado com 4% de sacarose, para seleção das linhagens que perderam o plasmídeo pNPTS Δ *parB* na segunda recombinação. Os transformantes desta segunda recombinação foram selecionados em placas contendo meio NYG (gentamicina) e meio NYG (canamicina). Os sensíveis à canamicina e resistentes à sacarose foram considerados candidatos positivos e foram usados em reação de PCR para confirmação da deleção de *parB*.

5.8 Curva de crescimento

Foram realizadas curvas de crescimento em triplicata, onde os transformantes *X. citri* tiveram seu padrão de crescimento comparado ao de *X. citri* wt.

Os transformantes de cada linhagem usados neste experimento foram selecionados a partir de uma triagem inicial, em triplicata, com três transformantes de cada linhagem. A triagem consistiu em um crescimento de 12 h em meio NYG com antibiótico a 29 °C e 200 rpm, a partir de uma D.O._{600nm} ~ 0,1. Medições de D.O._{600 nm} foram realizadas a cada 4 h e tiveram como controle *X. citri* wt. O objetivo dessa triagem foi selecionar transformantes com padrão de crescimento mais próximo ao de *X. citri* wt.

Tendo selecionado os transformantes, pré-inóculos foram preparados em meio NYG com antibiótico adequado e incubados por 16 h nas condições referenciadas; Após este período, a D.O._{600 nm} foi medida e ajustada para D.O._{600 nm} ~ 0,1 em 50 ml de meio NYG, em triplicata, seguindo as mesmas condições de cultivo. Medições de D.O._{600 nm} foram realizadas a cada 6 horas durante 24 horas de crescimento.

O indutor arabinose na concentração de 0,02 – 0,05% final (SUKCHAWALIT et al., 1999; GUZMAN et al., 1995) e glicose na concentração de 2% final, como repressor (G.C.

DANTAS e H. FERREIRA, dados não publicados) foram adicionadas com 6 horas de crescimento, quando necessário (Experimento de depleção e indução de ParB).

5.9 Expressão de proteínas.

Para detecção da proteína ParB-TAP nas culturas dos transformantes *X. citri*, foram inoculadas ~10 colônias isoladas em 50 ml de meio NYG líquido com antibiótico apropriado, com posterior incubação a 29 °C e 200 rpm por 16 h ou até que a cultura atingisse a D.O._{600 nm} ~ 0,8, quando então foram coletados 1,5 a 2 ml da cultura não induzida/reprimida em tubo de centrífuga de 2 ml. Para a remoção da goma, centrifugou-se a amostra a 11000xg por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 µl de água destilada esterilizada, levou-se ao vortex brevemente, centrifugou-se novamente e pesou-se o pellet, o qual foi armazenado à -20 °C para processamento posterior.

O restante da cultura foi dividido em dois erlenmeyers, sendo que em um deles foi adicionado arabinose nas concentrações de 0,02 ou 0,05% final, para indução do promotor (GUZMAN et al., 1995) e no outro foi adicionado glicose na concentração de 2% final, para repressão (G.C. DANTAS e H. FERREIRA, dados não publicados); Posteriormente as culturas foram incubadas nas mesmas condições referenciadas.

Amostras com indução ou repressão do promotor foram coletadas com 1h após à adição de arabinose e com 2h após à adição de glicose; Ambas foram tratadas nas mesmas condições descritas acima.

5.10 SDS-PAGE e Western Blotting

Para preparação do extrato de proteínas totais, adicionou-se tampão de amostra contendo SDS, na proporção de 90 µl 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 TAP na membrana de PVDF (GE), foi utilizado anticorpo secundário anti-IgG de cavalo Sigma A2014. Reação de quimioluminescência seguiu as recomendações contidas no kit ECL.

5.11 Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI

Métodos seguiram Martins et al. (2010). Para observação do fenótipo resultante da depleção ou superexpressão da proteína ParB, linhagens foram cultivadas durante a noite em meio NYG líquido com antibiótico; Em seguida, as culturas foram diluídas para uma D.O._{600nm} ~ 0,1 e com base nos dados de curva de crescimento, após 6 h foi adicionado arabinose em uma concentração final de 0,05% ou glicose numa concentração final de 2%. Amostras foram observadas após 18h de crescimento ou 12h após a adição dos açúcares. Para isso, as amostras foram imobilizadas em lâminas contendo agarose 1% em PBS 1X.

Como controle, a mesma linhagem do experimento em curso foi cultivada nas mesmas condições referenciadas sem adição de arabinose ou glicose.

Microscopia de fluorescência foi realizada através do tratamento das células com DAPI (2- (4-amidinofenil) -1H-indole-6-carboxamida) 300nM por 5 minutos e lavadas em seguida com PBS 1X.

Microscópio BX-61 Olympus de fluorescência e software CellSens Dimension foram utilizados nesse experimento.

5.12 Análise estatística

Os dados de D.O. de curva de crescimento foram avaliados pelo teste t de *Student* múltiplo (um por linha), ou seja, a média de cada ponto na curva foi analisada separadamente, com nível de significância de 5 %.

Na microscopia, o *software* CellSens Dimension foi usado para medir 200 células por amostra (triplicata), em seguida, os dados foram avaliados pelo teste t de *Student* com nível de significância de 5 %. Todas as análises estatísticas e gráficos foram gerados por meio do *software* Graphpad Prism 6.

5.13 Testes de patogenicidade

Para confirmar que a presença dos vetores de expressão não altera a virulência em *X. citri* e que estes vetores podem ser usados como ferramentas para estudo de expressão gênica, realizamos teste de patogenicidade onde as linhagens foram cultivadas em meio NYG com

antibiótico a 29 °C e 200 RPM, até atingirem a D.O. $_{600nm} \sim 0,8$. Em seguida, foram inoculadas pelo método de perfuração com agulhas de seringas hipodérmicas, na superfície abaxial das folhas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). As folhas foram assepticamente cortadas dos ramos com estilete e mantidas em tubos de polipropileno de 50 ml, com água tratada esterilizada até a metade do pecíolo; Foram mantidas no laboratório por um período de 60 dias, com a superfície adaxial voltada para a área de maior claridade. Este teste foi realizado em triplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Viabilidade dos transformantes Xac-pLAC1 e Xac-pLAC2

Considerando que a presença de replicons (extra-cromossômicos) em células bacterianas usualmente retardam o crescimento e metabolismo celular, foi medido o efeito da presença dos sistemas de expressão pLAC1 e pLAC2 em Xac. Para tal, os transformantes Xac-pLAC1 e Xac-pLAC2 foram avaliados em curvas de crescimento (Figura 5).

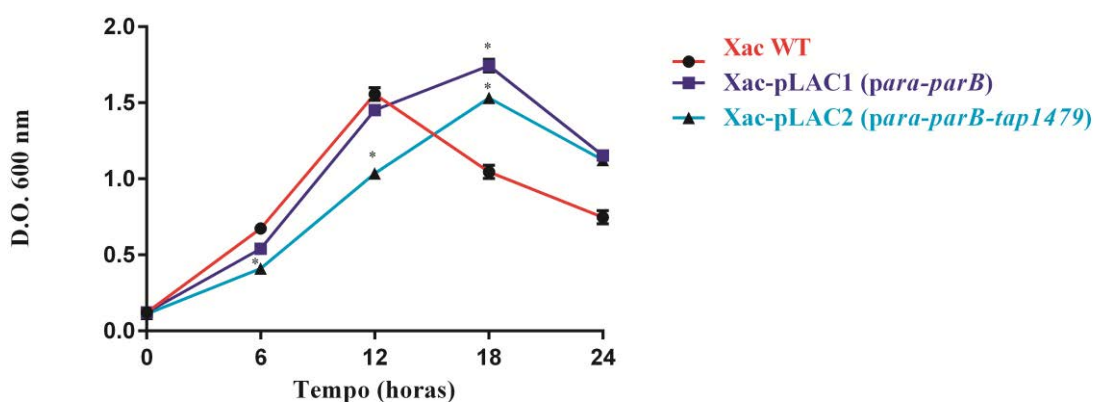
O transformante Xac-pLAC1 apresentou nesta análise um padrão de crescimento semelhante ao controle *X. citri* wt. Observamos, entretanto, que o crescimento do transformante é significativamente mais lento em relação ao de *X. citri* wt no pontos referentes a 18 e 24h. Notamos ainda que a cultura de *X. citri* wt atinge o declínio mais rapidamente, enquanto Xac-pLAC1 permanece por um período mais longo na fase log e que equivale a praticamente 3 ciclos celulares (~6 h).

Com relação ao transformante Xac-pLAC2 (Figura 5, linha ciano) vemos um retardo bem mais acentuado no perfil de crescimento e que pode refletir a presença da região codificando para a fusão ParB-TAP.

O padrão de crescimento mais lento das linhagens transformantes, em relação à selvagem, em meio NYG líquido, está coerente com o padrão de crescimento em meio NYG ágar. Em meio sólido, percebemos que as linhagens transformantes desenvolvem colônias visíveis a olho nú em aproximadamente 72 h, enquanto a linhagem selvagem produz colônias em 48 h de crescimento (dados não mostrados).

Apesar dos transformantes mostrarem um padrão de crescimento diferente quando comparados à *X. citri* wt, ambos foram viáveis em condições controladas de crescimento.

Figura 5: Curva de crescimento de *X. citri* wt, Xac-pLAC1 e Xac-pLAC2.



X. citric wt (controle), Xac-pLAC1 e Xac-pLAC2 foram cultivadas em triplicata a partir da D.O. _{600nm} ~0,1 em meio NYG a 29 °C e 200 rpm. Medições foram realizadas a cada 6 h durante 24 h de crescimento. Os pontos representam o desvio padrão calculado a partir da média de cada triplicata. Os pontos em que a barra não aparece indicam desvios-padrão muito baixos. Aos dados, foi aplicado o test t de *Student* Múltiplo (um por linha), ou seja, a média de cada ponto na curva foi analisada separadamente, com nível de significância de 5%*.

6.2 Funcionalidade do promotor de arabinose em *X. citri*.

A funcionalidade do promotor de arabinose foi avaliada utilizando-se o sistema pLAC2, pois este expressa a proteína de fusão ParB-TAP. Como já mencionado, a cauda TAP nos permite seguir a expressão de ParB-TAP em experimentos de western sem a necessidade de anticorpo específico anti-ParB.

Xac-pLAC2 foi cultivada em triplicata em meio NYG por 14 h a 29 °C e 200rpm. Em seguida as culturas foram diluídas para uma D.O. _{600nm} ~0,1 e retornaram às mesmas condições de cultivo.

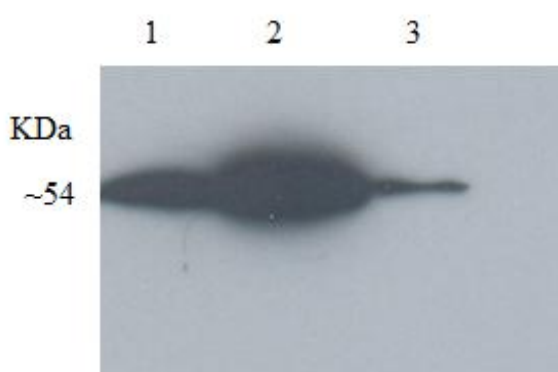
Quando as culturas atingiram a D.O. _{600nm} ~0,6, foi adicionado 0,02% do indutor (GUZMAN et al., 1995; SUKCHAWALIT et al., 1999) ou 2% de repressor (G.C. DANTAS e H. FERREIRA, dados não publicados); Amostras foram coletadas para western após 1h e 2h, respectivamente (Figura 6).

Concentrações de arabinose tão baixas quanto 0,02% são suficientes para induzir fortemente o promotor de arabinose em *E. coli* (GUZMAN et al., 1995), assim como em membros do gênero *Xanthomonas* e em *P. aeruginosa* (SUKCHAWALIT et al., 1999). Em Xac-pLAC2, foi observado um forte nível de indução após 1 h seguida da adição de

arabinose (Figura 6, canaleta 2); Nota-se banda de ~54 kDa que é o tamanho esperado para ParB-TAP. Entretanto, é observado na canaleta 1 (figura 6), que a expressão basal do promotor em Xac-pLAC2, assim como em *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e também em *P. aeruginosa* (SUKCHAWALIT et al., 1999), não é tão regulada como em *E. coli* (GUZMAN et al., 1995). Além disso, a repressão total em Xac-pLAC2 não foi alcançada após 2 h seguidas da adição de glicose (canaleta 3).

Ainda sim, quando comparado a outros promotores testados por nosso grupo, até então (xilose e o de vanilato; MARTINS et al., 2010; UCCI et al., 2014), o promotor arabinose mostrou um controle mais fino de repressão/indução, que é percebido com nitidez quando comparamos o nível de ParB-TAP nas canaletas 1 (expressão basal), 2 (indução) e 3 (repressão).

Figura 6: Western Blotting para detectar ParB-TAP nos extratos proteicos da linhagem Xac-pLAC2.



Canaletas: 1) Xac-pLAC2 expressão basal (D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 0,6$); 2) Xac-pLAC2 após 1 h de indução com 0.02% de arabinose; 3) Xac-pLAC2 após 2h de repressão com 2% de glicose. Sinal de ~54 kDa corresponde ao tamanho esperado para ParB-TAP.

6.3 Deleção de *parB* em Xac-pLAC2

Sendo o *para* responsivo em Xac-pLAC2, seguimos com a deleção do gene *parB* cromossômico nessa linhagem.

Inicialmente, utilizamos para esta deleção a linhagem selvagem 306 portando o vetor pLAC2 gerado no presente trabalho (Xac-pLAC2). Tal vetor, possui cópia de *parB* sob

controle do promotor de arabinose e tem por finalidade produzir a proteína de fusão ParB-TAP em *trans* e garantir a presença de uma espécie de ParB na célula após a deleção gênica, pois dados recentes em nosso grupo de trabalho (UCCI et al., 2014) apontam a necessidade de *parB* em *X. citri*. Até o momento, somente conseguimos deletar sequências *parB* em *X. citri* quando introduzimos cópias extras do gene em um sistema plasmidial.

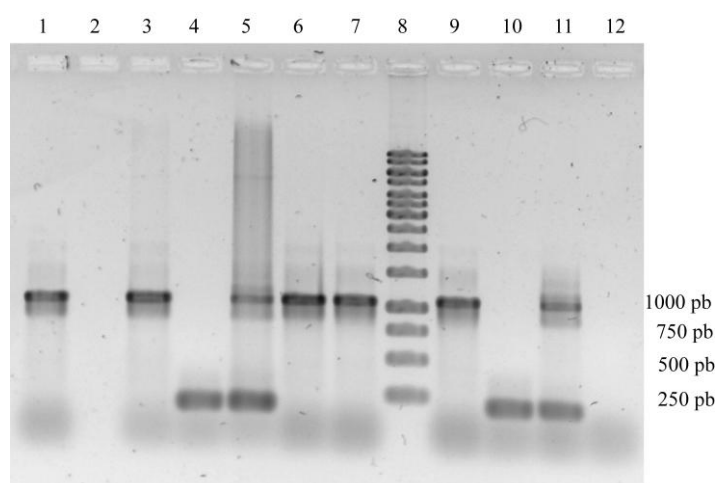
A deleção foi gerada mediante dois eventos de recombinação homóloga entre sequências flanqueadoras do gene em estudo, previamente ligadas ao vetor suicida pNPTS138, e a cópia nativa de *parB* no cromossomo bacteriano. Seguindo-se o processo de deleção, colônias candidatas foram submetidas a PCR diagnóstico para averiguar a perda da sequência codificando para ParB (Figura 7). Nesta PCR, utilizamos um par de primers que possuem como alvos de hibridização regiões contidas nas sequências flanqueadoras de *parB* cromossômico (coordenada genômica c4592668...4593677), não hibridizariam no vetor de complementação pLAC2 presente em *X. citri*. Observamos a produção de um fragmento de ~1000 pb a partir do DNA extraído de *X. citri* wt e que porta o gene *parB* (canaleta 1; controle positivo). A ausência de *parB* neste fragmento geraria um produto de 187 pb, que foi observado nas canaletas 4 e 10, sendo estes, portanto, mutantes com deleção do gene de interesse. De 100 colônias candidatas, 35 foram positivas para deleção de *parB* cromossômico. Isto representa uma taxa de 35% de eficiência da metodologia.

Para certificarmos que os mutantes de deleção para *parB* cromossômico portavam a cópia de *parB* no vetor replicativo pLAC2 e que garantiria a produção de ParB em *trans* (complementação) fizemos uma PCR diagnóstico para *parB* utilizando agora um par de primers que anelam no interior do gene (Figura 8). Selecionamos para este teste 4 candidatos positivos para a deleção do diagnóstico anterior (canaletas 1-4) e com a nova PCR diagnóstico detectamos produção de fragmento do tamanho característico de *parB* de ~900 pb.

Também realizamos todos os passos referenciados para deleção de *parB* em *X. citri* 306, anteriormente transformada com o vetor pLAC1 (Xac-pLAC1). Este vetor possui cópia de *parB* sob controle do promotor arabinose, porém sem fusão à *tap* (dados não mostrados). O objetivo é comparar os fenótipos das duas linhagens mutantes *parB* (com *tap* e sem *tap*) em experimentos futuros.

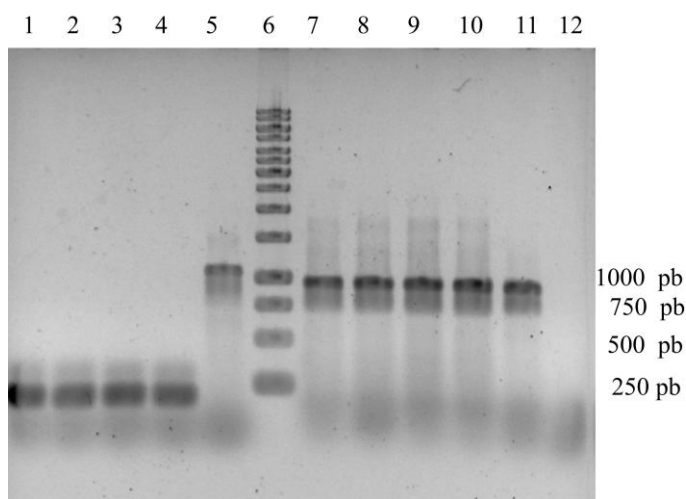
A deleção de *parB* cromossômico em Xac-pLAC1 e em Xac-pLAC2 gerou respectivamente Xac Δ *parB*-pLAC1 e Xac Δ *parB*-pLAC2.

Figura 7: PCR diagnóstico para presença de *parB* em Xac-pLAC2 (*para-parB-tap1479*).



Os produtos de PCR diagnóstico foram separados em gel de agarose 0,7% e corados em banho de gelred 0,5% previamente a documentação. Canaletas: 1) Xac wt, controle positivo, 2) vazia. 3-7 e 9-11), linhagens candidatas a deleção 4 e 10), candidatos positivos para deleção de *parB*, 8) marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder 250 a 10.000 bp – Thermo Scientific, 12) controle negativo.

Figura 8: PCR diagnóstico para detecção de *parB* em pLAC2 (*para-parB-tap1479*).



Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 0,7% , corados com gelred 0,5% e fotografados . Canaletas: 1-4) repetição do PCR diagnóstico para deleção de *parB* cromossômico, 5) Xac wt, controle positivo, 6) marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder 250 a 10.000 bp – Thermo Scientific, 7-10) quatro linhagens selecionadas em PCR para detecção de *parB* plasmidial, 11) repetição da canaleta 10, 12) controle negativo.

6.4 Depleção e Indução de ParB – Curva de crescimento

Para estudarmos o fenótipo de depleção e superexpressão de ParB em *X. citri*, realizamos curvas de crescimento para a linhagem *XacΔparB*-pLAC2 e *X. citri* wt (controle), com o diferencial de adição de 0,05% de arabinose (GUZMAN et al., 1995; SUKCHAWALIT et al., 1999) e alternativamente 2% de glicose após um período de 6 h de crescimento (Figura 9). Medições de D.O._{600nm} foram feitas a cada 6 h durante 24 h de crescimento, onde alíquotas das culturas de *XacΔparB*-pLAC2 foram coletadas para detecção de ParB-TAP por Western blotting.

Em comparação com *XacΔparB*-pLAC2 na condição de expressão basal (Figura 9 C, linha vermelha), notamos um retardo no padrão de crescimento da cultura logo após a adição do indutor arabinose (compare progressão das curvas da linha vermelha e linha ciano às 6 e 12 h). Na presença do repressor glicose, vemos alteração do padrão de crescimento somente após 6 h da adição do repressor (linha azul; compare trecho entre 12 e 18 h).

Quando relacionamos a linha ciano da figura 9 C com a detecção de ParB-TAP por Western blot da canaleta 2 da figura 9 A, percebemos que há um nível maior desta proteína na cultura onde o indutor foi adicionado já às 12 h, indução rápida condizente com a caracterização do sistema pBAD em *E. coli* (GUZMAN et al., 1995), bem como acontece em *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli e em *P. aeruginosa* (SUKCHAWALIT et al., 1999).

A repressão de ParB-TAP só é percebida com 18 h de cultivo (Figura 9 A, canaleta 3 e Figura 9 C, linha azul), período correspondente à fase estacionária. De fato, a fase estacionária mostrou ser um fator limitante na expressão do *para* heterólogo em *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli e em *P. aeruginosa*, onde o nível basal de expressão, bem como o de indução é reduzido consideravelmente quando comparado à fase exponencial (SUKCHAWALIT et al., 1999). Especula-se uma possível redução no transporte de L-arabinose, bem como, uma redução no nível do fator sigma que reconhece pBAD durante a fase estacionária de crescimento.

Na condição de expressão basal (Figura 9 A, canaleta 1 e Figura 9 C, linha vermelha), ParB-TAP manteve-se estável ao final de 24 h de crescimento, com uma leve diminuição do sinal apenas na fase estacionária correspondente às 18 h na curva.

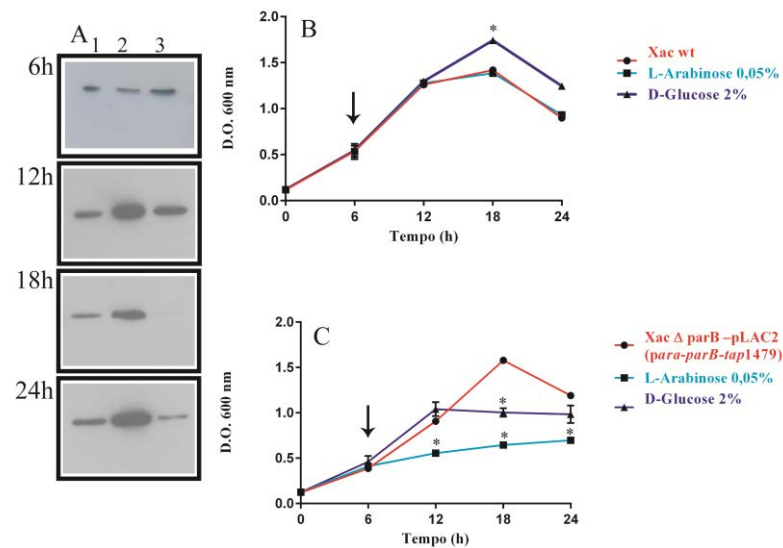
Observamos que a linhagem *X. citri* wt (Figura 9 B, controle) respondeu de forma diferente na curva de crescimento, frente aos mesmos estímulos aplicados à *XacΔparB*-pLAC2 (Figura 9 C), eliminando possíveis dúvidas em relação à interferência do metabolismo dos açúcares no retardo da curva de crescimento de *XacΔparB*-pLAC2.

Vemos assim que os dados de alteração do padrão de crescimento das culturas de *XacΔparB-pLAC2*, frente à diferentes estímulos de indução e repressão, foram perfeitamente acompanhados pela presença e ausência de ParB-TAP nas células. Na condição de superexpressão, 6 h de crescimento com arabinose ou 12 h no gráfico, percebe-se um retardo na curva, que culmina em um platô com D.O. significativamente inferior à atingida pelo controle (D.O. não atinge 1). Na condição de depleção de ParB-TAP, percebemos alteração da curva somente após 6 h da adição da glicose e a queda/desaparecimento de ParB-TAP só foi documentada após 12 h da adição da glicose (tempo 18 h na curva), que corresponde à fase estacionária.

O reaparecimento de ParB-TAP no tempo de 24 h de crescimento (Figura 9 A, canaleta 3) deve-se provavelmente ao esgotamento do repressor que é metabolizado pelas células. Segundo Kang et al. (1999) e Vojnov et al. (2001) *Xanthomonas* degradam glicose para a produção de EPS (exopolissacarídeo) na fase estacionária tardia, onde os operons que codificam as enzimas envolvidas neste processo são ativados pela alta densidade celular. Isto reflete uma estratégia de sobrevivência, já que a goma xanthana (exopolissacarídeo) atua na dispersão desta bactéria e na colonização de hospedeiros cítrus (DUNGER et al., 2007).

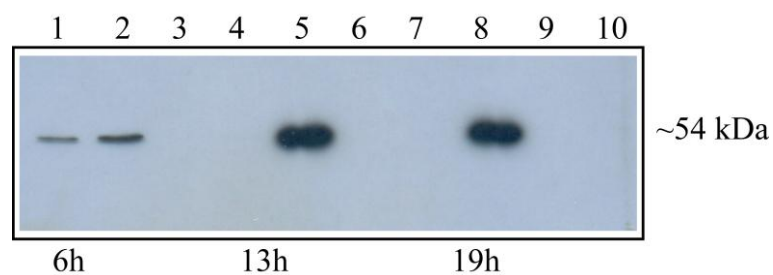
A ausência de ParB-TAP é mantida na curva de crescimento por um período aproximado de 6h, que corresponde a 3 ciclos celulares e que compreende aproximadamente entre às 13 e 19h de crescimento; Veja na figura 10, as canaletas 1 e 2 representam amostras da cultura de *XacΔparB-pLAC2* na condição de expressão basal, com 6h de crescimento, antes da adição do indutor ou repressor. Canaletas 4 e 7 são amostras com repressão de *parB-tap* (glicose 2%), coletadas respectivamente às 13 e 19h de crescimento; Canaletas 5 e 8 são amostras induzidas (arabinose 0,05%), coletadas respectivamente às 13 e 19h de crescimento.

Figura 9: Curva de crescimento de *X. citri* wt e *Xac* Δ *parB*-pLAC2 com detecção de ParB-TAP por Western Blotting.



X. citri wt e *Xac* Δ *parB*-pLAC2 foram cultivadas a partir da D.O. _{600nm} ~0,1 em meio NYG a 29 °C e 200 rpm. Arabinose 0,05% e glicose 2% foram adicionadas, separadamente, às culturas com 6 h de crescimento. Setas pretas indicam o horário da adição dos açúcares. Medições de D.O. _{600nm} foram realizadas a cada 6 h durante 24 h. Aliquotas em triplicata foram retiradas das culturas de *Xac* Δ *parB*-pLAC2 para detecção de ParB-TAP por Western Blotting. Os pontos no gráfico representam o desvio padrão calculado a partir da média de cada triplicata. No filme de Raio-X, 1, 2 e 3 são, respectivamente, controle, amostra induzida (arabinose 0,05%) e amostra com repressão de *parB-tap* (glicose 2%). No gráfico, os pontos em que a barra não aparece indicam desvios-padrão muito baixos. Aos dados, foi aplicado o teste t de *Student* Múltiplo (um por linha), ou seja, a média de cada ponto foi analisada separadamente, com nível de significância de 5%*.

Figura 10: Detecção de ParB-TAP por Western Blotting.



A ausência de ParB-TAP é mantida na curva de crescimento por um período aproximado de 6h. *Xac* Δ *parB*-pLAC2 foi cultivada a partir da D.O. _{600nm} ~0,1 em meio NYG a 29 °C e 200 rpm. Arabinose 0,05% e

glicose 2% foram adicionadas, separadamente, às culturas com 6 h de crescimento. Aliquotas foram retiradas para detecção de ParB-TAP por Western Blotting. No filme de Raio-X, 1e 2 são referentes às amostras não induzidas coletadas com 6h de crescimento; 4 e 7 são amostras com repressão de *parB-tap* (glicose 2%), coletadas respectivamente às 13h e 19h de crescimento; 5 e 8 são amostras induzidas (arabinose 0,05%), coletadas respectivamente às 13h e 19h de crescimento. Canaleta 3, onde foi aplicado o marcador de peso molecular no gel de poliacrilamida. Tampão de amostra para o equilíbrio da corrida foi aplicado nas canaletas 6,9 e 10.

Apartir desses dados, fixamos o ponto de 18h na curva de crescimento como ideal para analisar, através de microscopia, possíveis alterações morfológicas decorrentes da depleção ou superexpressão de ParB-TAP em *X. citri*, que indicariam falhas no processo de segregação cromossômica (BARTOSIK et al., 2009; DONOVAN et al., 2010; MOHL e GOBER 1997), apontando para a necessidade de ParB na segregação cromossômica (PTACIN et al., 2010).

6.5 Fenótipos da complementação de ParB em *X. citri*.

Em muitas espécies, a relação estequiométrica ParA:ParB representa ser muito importante no processo de partição cromossômica (BARTOSIK et al., 2004, 2009; LASOCKI et al., 2007), sendo que a estabilidade de ParA é dependente de ParB e vice-versa, ou seja, a interação entre estas proteínas forma um complexo de estabilidade para ambas (BARTOSIK et al., 2009).

Em *P. aeruginosa*, por exemplo, a falta de *parA* leva ao acúmulo de efeitos pleiotrópicos como defeitos na segregação cromossômica, taxa de crescimento e motilidade que não podem ser complementados com *parA* em *trans*. Além disso, a falta de *parA* leva à degradação de ParB, refletindo um mecanismo de controle de expressão do operon *parAB* na fase estacionária de crescimento. (BARTOSIK et al., 2004, 2009; LASOCKI et al., 2007).

No presente trabalho, a presença de ParB em *trans* é perfeitamente funcional e não acumulou diferenças expressivas na morfologia e no número de células anucleadas ou aberrações em *X. citri* (Tabela 1). O padrão normal de divisão celular como septo formado no *midcell* separando dois núcleos foi frequentemente visualizado (Figura 11); Além disso, essa complementação não alterou a capacidade de *X. citri* em induzir sintomas típicos de cancro cítrico, como será mostrado adiante.

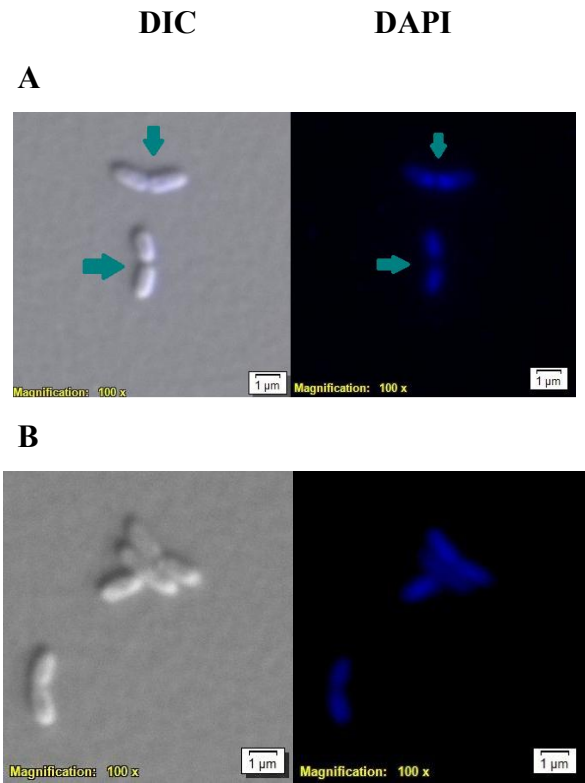
Sendo esta complementação funcional, seguimos com nossas análises explorando as condições de depleção ou superexpressão de ParB-TAP em *X. citri*.

Tabela 1: Análises morfológicas de *XacΔparB*-pLAC2.

	Tamanho celular (n= 500) μm	Anucleadas	Aberrações
<i>X. citri</i> wt	1,58 ± 0,32	0,2%	0,08%
<i>XacΔparB</i> -pLAC2 (C)	1,73 ± 0,37	0,3%	0,17%

Dados correspondentes ao tamanho médio das células com 18h de crescimento. Desvio padrão. P < 0,05. One-way ANOVA com teste de t (*Student*). (C) Indica o estado de expressão basal de *parB-tap*.

Figura 11: Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI de *Xac* wt e *XacΔparB*-pLAC2 (C) na condição de expressão basal de *parB-tap*.



A) *Xacwt*; Setas verdes indicam padrão normal de uma célula em divisão. B) *XacΔparB*-pLAC2 (C) na condição de expressão basal de *parB-tap* Aumento de 100X.

6.6 Fenótipos da depleção de ParB em *X. citri*

Neste trabalho, no ponto de 18h fixado na curva de crescimento (Figura 9C), as alterações morfológicas decorrentes da depleção de ParB-TAP são sutis porém significativas; Em nossas análises, o tamanho médio das células de *XacΔparB*-pLAC2 (G) foi $2,17 \mu\text{m} \pm 0,46$ (n=500; Tabela 2), enquanto o tamanho médio de *XacΔparB*-pLAC2 (C) foi $1,73 \pm 0,37$ (n=500; Tabela 2), refletindo assim a influência da depleção de ParB no tamanho celular.

O número de células anucleadas foi significativo em quase uma ordem de magnitude correspondendo a 2% em *XacΔparB*-pLAC2 (G) contra 0,3% em *XacΔparB*-pLAC2 (C) (Tabela 2, Figura 12B, setas vermelhas). Uma vez que ParB atua na segregação cromossômica (PTACIN et al., 2010), sua falta pode acarretar em falhas neste processo e resultar em um aumento considerável no número de células anucleadas em cultura (BARTOSIK et al., 2004, 2009; IRETON et al., 1994; JAKIMOWICZ et al., 2007; LEE et al., 2003; LEWIS et al., 2002). Como exemplo, *Pseudomonas putida* mutantes nulos *parB*, acumulam de 5 a 10% de células anucleadas, quando cultivadas em meio mínimo e durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária (LEWIS et al., 2002). Em *Bacillus subtilis*, mutações em *spo0J* (homólogo *parB*), produzem 1 a 2% de células anucleadas durante o crescimento vegetativo (IRETON et al., 1994; LEE et al., 2003). Já em *Mycobacterium smegmatis* deletados em *parB*, a taxa de células anucleadas em cultura é em média 10%, contra 0,8% na linhagem do tipo selvagem (JAKIMOWICZ et al., 2007).

A depleção de ParB-TAP em *X. citri* acumulou 1 a 2% de aberrações celulares como formação de cadeias (Figuras 12B e C, setas brancas) e septo localizado fora do *midcell* (Figura 12C, seta branca), refletindo fenótipos decorrentes de defeitos de segregação cromossômica.

Também foi observado queda na taxa de crescimento (Figura 9C, linha azul), o que deve refletir um efeito pleiotrópico da falta de ParB nas células em cultura. Diversos efeitos pleiotrópicos associados à perturbação de *parB* já foram descritos para outros micro-organismos como *C. crescentus*, *C. glutamicum* e *P. aeruginosa* (MOHL e GOBER, 1997; BARTOSIK et al., 2009; DONOVAN et al., 2010). Tais efeitos são descritos como baixa taxa de crescimento e motilidade, perda de virulência, formação de filamentos e podem ocorrer pela interação de ParB com proteínas envolvidas em outros processos além de segregação cromossômica e divisão celular (MOHL e GOBER, 1997; BARTOSIK et al., 2009; DONOVAN et al., 2010; UCCI et al., 2014).

Tabela 2: Análises morfológicas de *XacΔparB*-pLAC2.

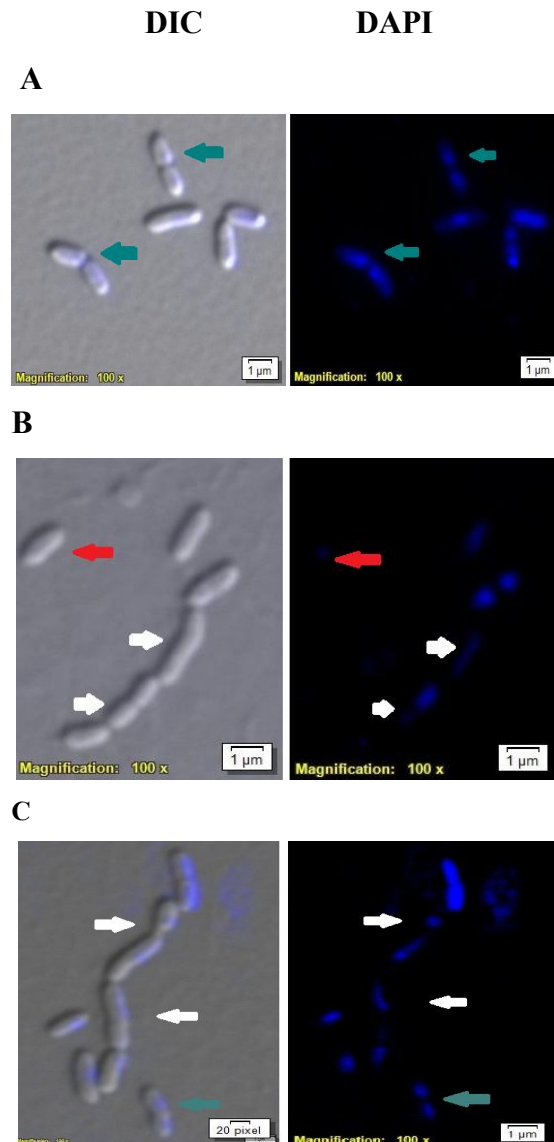
	Tamanho celular (n= 200) μm	Anucleadas	Aberrações
<i>XacΔparB</i> -pLAC2 (C)	$1,73 \pm 0,37$	0,3%	0,17%
<i>XacΔparB</i> -pLAC2 (G)	$2,17 \pm 0,46^*$	2%	1 – 2%

Dados correspondentes ao tamanho médio das células com 18h de crescimento. Desvio padrão. *P < 0,05. One-way ANOVA com teste de t (*Student*). (C) Indica o estado de expressão basal de *parB-tap* (linha vermelha no gráfico da figura 9C); (G) Indica o estado de depleção de *parB-tap* (linha azul).

Em *C. crescentus* a ausência de ParB promove um bloqueio no processo de divisão celular, que é atribuído a defeitos na montagem do anel de FtsZ, resultando em acúmulo de células filamentosas em cultura (MOHL et al., 2001). FtsZ (homólogo de tubulina) atua no correto posicionamento do septo de divisão celular e é dependente do correto funcionamento do complexo *par* e sua interação com MipZ (inibidor de FtsZ) nos polos das células (MOHL et al., 2001; THANBICHLER e SHAPIRO, 2006). É sugerido que *X. citri* tenha um padrão de segregação cromossômica semelhante ao de *C. crescentus*, demonstrado através do padrão de localização subcelular de ParB-GFP, que indica sua ligação às regiões de origem no cromossomo sendo guiadas aos pólos da célula para que ocorra a correta segregação cromossômica (UCCI et al., 2014). No presente trabalho, entretanto, a depleção de ParB em *X. citri* promoveu efeitos sutis sem ocorrência de células filamentosas; A exceção são algumas células alongadas encontradas de forma esporádica em alguns dos experimentos (Figura 13), o que reforça a ideia de uma função acessória ou pontual de ParB em *X. citri*, diverso à *C. crescentus* onde os genes *par* são essenciais para sobrevivência (MIERZEJEWSKA e BURDZY, 2012; MOHL e GOBER, 1997).

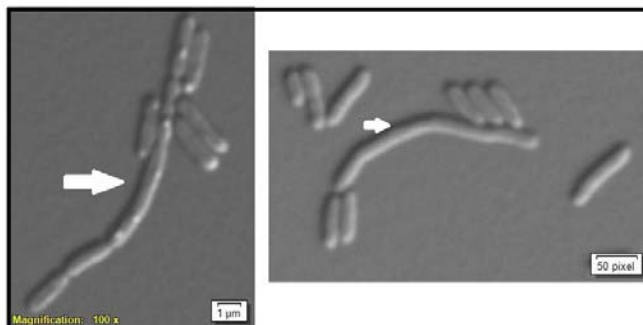
Sendo assim, buscamos sanar nossas dúvidas em relação a um possível efeito cumulativo desta proteína em *X. citri*. A estratégia consistiu em prolongar a ausência de ParB-TAP por vários ciclos celulares de *XacΔparB*-pLAC2; Para isso, repetimos esse experimento de depleção (Figura 9C), com o diferencial de trocar o meio de cultura a partir das 18h de crescimento, a cada 2h até que a cultura completou 24h de crescimento e 3 ciclos celulares a mais com ausência de ParB-TAP. Nossas análises de microscopia não revelaram diferenças morfológicas relevantes, além daquelas encontradas com 18h de crescimento, relacionadas na tabela 1 (dados não mostrados).

Figura 12: : Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI de *XacΔparB*-pLAC2 (C) na condição de expressão basal de *parB-tap* e *XacΔparB*-pLAC2 (G) na condição de depleção de ParB-TAP.



A) *XacΔparB*-pLAC2 controle (C); Setas verdes indicam padrão normal de uma célula em divisão. B e C) *XacΔparB*-pLAC2 glicose 2% (G); Alterações morfológicas e padrão anormal de divisão celular estão indicadas pelas setas brancas (aberrações como formação de cadeias) e setas vermelhas (células anucleadas). Aumento de 100X.

Figura 13: Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) de *XacΔparB*-pLAC2 na condição de ausência de ParB-TAP.



Setas brancas indicam células alongadas encontradas esporadicamente em alguns dos experimentos de curva de crescimento na presença de glicose 2%. Aumento de 100X.

6.7 Fenótipos da superexpressão de ParB em *X. citri*

Assim como na condição de depleção de ParB-TAP (Tabela 2, Figura 12B e C), a superexpressão também promoveu diferenças fenotípicas sutis, entretanto, significativas.

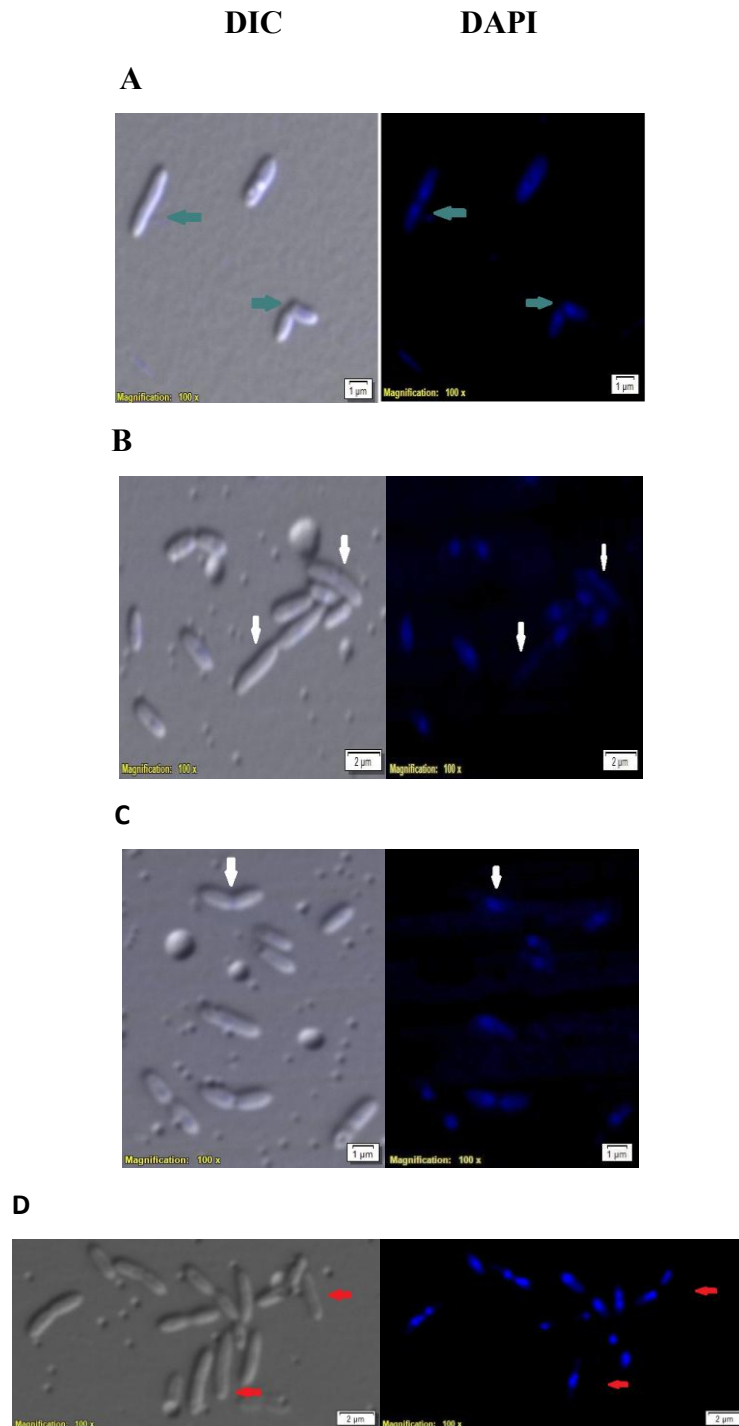
O tamanho das células no tratamento com arabinose (*XacΔparB*-pLAC2 (A)) foi $2,23 \pm 0,49$ (n=500; Tabela 3) e o aumento de células anucleadas foi significativo em quase uma ordem de magnitude correspondendo 2% contra 0,3% em *XacΔparB*-pLAC2 (C) (Figura 14D, setas vermelhas). Aberrações como erro de divisão celular foram encontradas em uma média de 1 a 2% e são representadas por deslocamento do núcleo (Figura 14B, setas brancas) e núcleo posicionado no *midcell* quando há presença de septo (Figura 14C, setas brancas).

Tabela 3: Análises morfológicas de *XacΔparB*-pLAC2.

	Tamanho celular (n= 500) μm	Anucleadas	Aberrações
<i>XacΔparB</i> -pLAC2 (C)	$1,73 \pm 0,37$	0,3%	0,17%
<i>XacΔparB</i> -pLAC2 (A)	$2,23 \pm 0,49^*$	2%	1 – 2%

Dados correspondentes ao tamanho médio das células com 18h de crescimento. Desvio padrão. *P < 0,05. One-way ANOVA com teste de t (*Student*). (C) Indica o estado de expressão basal de *parB-tap* (linha vermelha no gráfico da figura 9C); (A) Indica o estado de superexpressão de *parB-tap* (linha ciano).

Figura 14: Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e DAPI de *XacΔparB-pLAC2* (C) na condição de expressão basal de *parB-tap* e *XacΔparB-pLAC2* (A) na condição de superexpressão de *parB-tap*.



(A) na condição de superexpressão de *parB-tap*. A) *XacΔparB-pLAC2* controle (C); Setas verdes indicam padrão normal de uma célula em divisão. B, C e D) *XacΔparB-pLAC2* arabinose 0,05% (A); Aberrações como padrão anormal de divisão celular estão indicadas pelas setas brancas e células anucleada estão indicadas por setas vermelhas. Aumento de 100X.

Estas alterações fenotípicas (tamanho celular, células anucleadas ou com erro de divisão) só foram observadas com 18h de crescimento. Com tudo, na condição de superexpressão de *parB*, observamos que ocorre um retardo drástico no crescimento logo após a adição do indutor (Figura 9C) e que pode estar relacionada a um retardo da replicação cromossômica devido a um excedente de proteínas ParB-TAP ligadas nas regiões próximas de *oriC*. Uma vez que ParB tem a propriedade de formar dímeros e se ligar às regiões *parS* e também em vários sítios ao redor de *oriC* (Lin & Grossman, 1998), um excesso pode resultar em falta de acessibilidade à proteína DnaA nessa região de origem, impedindo assim a montagem de um complexo multimérico que dá início à replicação (MESSER, W. , 2002). Efeitos semelhantes foram encontrados em *Mycobacterium smegmatis* na condição de superexpressão de *parB* e segundo Jakimowicz et al. (2007), o retardo na taxa de crescimento pode estar relacionado à formação de complexos nucleoproteicos, evitando novos ciclos de replicação e reduzindo a acessibilidade à enzima DnaA. Segundo Bartosik et al. (2014), atrasar o crescimento e divisão celular bacteriana acaba levando à segregação cromossômica por mecanismos alternativos ao sistema *par*.

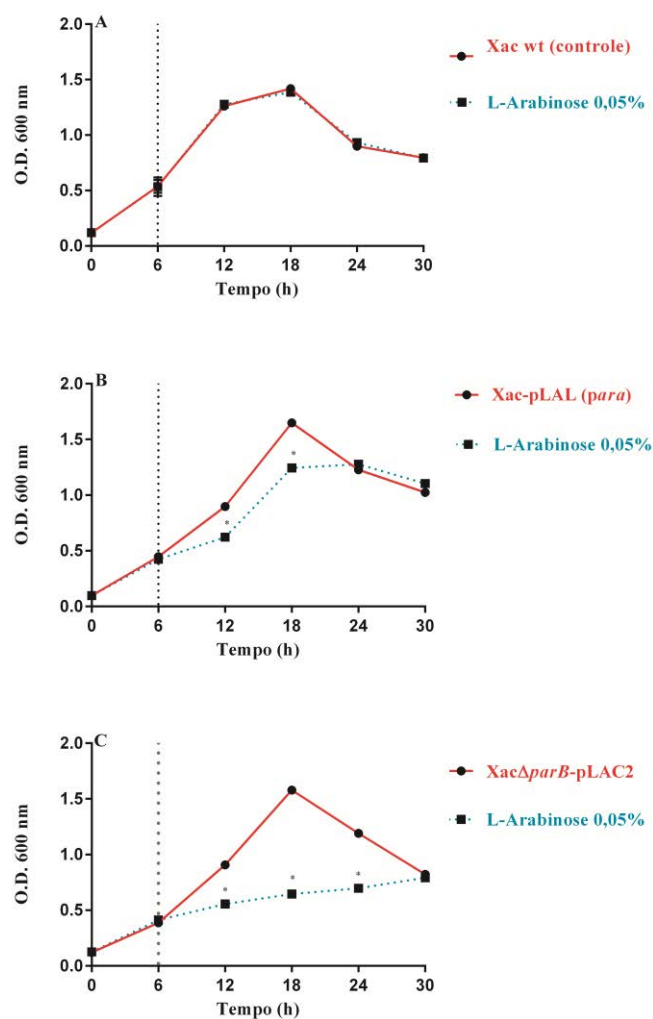
Em *M. smegmatis* (JAKIMOWICZ et al., 2007) e *P. putida* (LEWIS et al., 2002) a superexpressão de ParB além de afetar a taxa de crescimento também prejudica a segregação cromossômica acumulando em média 10% de células anucleadas em cultura; No entanto, excesso de ParB não é letal para nenhuma destas bactérias (JAKIMOWICZ et al., 2007; LEWIS et al., 2002) assim como não demonstra ser letal para *X. citri*, já que a taxa de crescimento continua a aumentar, mesmo que lentamente (Figura 9C, linha ciano).

Isso motivou-nos a saber se a queda drástica na taxa de crescimento de *XacΔparB*-pLAC2, na presença do indutor, estaria de fato relacionada com o excesso de ParB-TAP ou seria um reflexo de um maior custo energético devido expressão dos genes *araB*, *araA* e *araD* que codificam as enzimas metabólicas que degradam arabinose, um açúcar secundário (SCHLEIF et al., 2000). Para isso, realizamos nova curva de crescimento na presença de arabinose 0,05%, onde as linhagens *X. citri* wt, *Xac*-pLAL (promotor de arabinose sem *parB*-*tap*, G.C. DANTAS e H. FERREIRA, dados não publicados) e *XacΔparB*-pLAC2 foram comparadas em relação ao padrão de crescimento, nas seguintes condições: Com indutor arabinose e sem indutor arabinose (Figura 15).

De fato, constatamos uma interferência significativa do metabolismo do promotor de arabinose atuando na taxa de crescimento da linhagem *Xac*-pLAL, refletindo o custo energético que este promotor implica (Figura 15 B); Observe que a taxa de crescimento é reduzida logo após a adição do indutor (linha ciano) e ao contrário, nenhuma alteração

significativa ocorre no crescimento de *Xac wt* na presença de arabinose (Figura 15 A). Entretanto, a presença de *parB-tap* em *XacΔparB*-pLAC2 mostra diferenças ainda mais expressivas na taxa de crescimento, nas mesmas condições (Figura 15 C). Dessa forma, ficou evidente a relação entre excesso de ParB-TAP e retardo no crescimento celular.

Figura 15: Curva de crescimento de *X. citri* wt, *Xac*-pLAL e *XacΔparB*-pLAC2 com indução por arabinose 0,05%.



A) *X. citri* wt, B) *Xac*-pLAL, C) *XacΔparB*-pLAC2. O indutor arabinose 0,05% foi adicionado no tempo de 6h de crescimento das culturas, representado por linha vertical pontilhada. Os pontos no gráfico representam o desvio padrão calculado a partir da média de cada triplicata. No gráfico, os pontos em que a barra não aparece indicam desvios-padrão muito baixos. Aos dados, foi aplicado o teste t de *Student* Múltiplo (um por linha), ou seja, a média de cada ponto foi analisada separadamente, com nível de significância de 5%*.

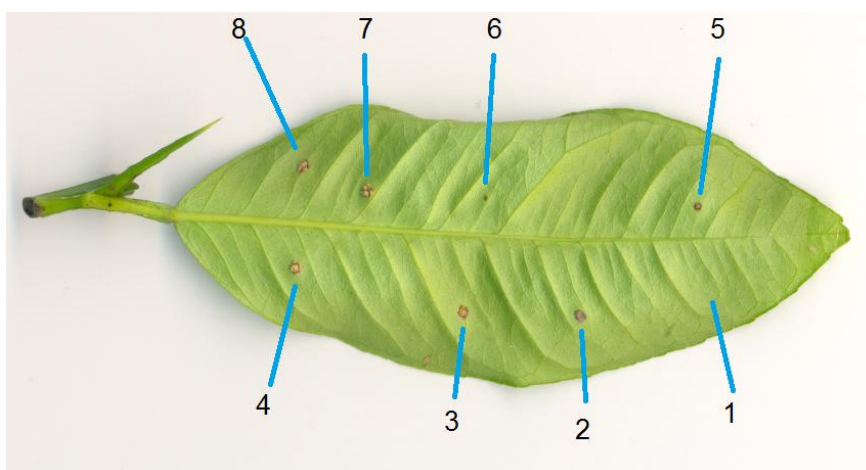
Existem outros relatos que a superexpressão de ParB perturba a divisão celular e a distribuição do nucleóide, inibindo o crescimento celular; (BARTOSIK et al., 2004; LASOCKI et al., 2007). Além disso, efeitos pleiotrópicos podem ser observados por causa de silenciamento de genes adjacentes às regiões *parS*, onde ParB se liga e espalha-se formando complexos nucleoproteicos (BARTOSIK et al., 2009, 2014).

Finalmente, a superexpressão de ParB-TAP em *X. citri* é acompanhada por um retardo na taxa de crescimento, aumento do tamanho celular e do número de células anucleadas ou com erro de divisão. Com tudo, essa perturbação parece não ser letal para *X. citri*.

6.8 Teste de patogenicidade

Uma ferramenta de trabalho que possibilite estudos de expressão gênica em *X. citri* deve ser validada em teste de patogenicidade, onde a simples introdução de um vetor ou sistema de expressão não deve alterar a virulência/patogenicidade da bactéria. Dizemos isto porque estas ferramentas poderão ser utilizadas para estudos de genes envolvidos com patogenicidade. Para averiguar se nossos vetores de expressão alterariam a habilidade de *X. citri* em colonizar um hospedeiro citros susceptível, inoculamos *X. citri* wt (controle), Xac-pBBR1 (controle), Xac-pLAC1, Xac Δ parB-pLAC1, Xac-pLAC2 e Xac Δ parB-pLAC2 pelo método de perfuração em folhas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). A presença do vetor pBBR1 (base de construção dos sistemas de expressão pLAC1 e pLAC2), bem como, as linhagens complementadas para deleção de *parB*, não tiveram a patogenicidade alterada e se comportaram como a linhagem selvagem. Lesões típicas de cancro cítrico manifestaram-se com 20 a 30 dias após a inoculação e tornaram-se mais proeminentes após 40 dias (Figura 16).

Figura 16: Teste de patogenicidade após 40 dias.



1) Meio NYG, 2) *X. citri* wt, 3) Xac-pBBR1, 4) Xac-pBBR1, 5) Xac-pLAC1, 6) Xac Δ parB-pLAC1, 7) Xac-pLAC2, 8) Xac Δ parB-pLAC2; Após 40 dias. As linhagens foram cultivadas em meio NYG a 29 °C e 200 rpm até a D.O._{600nm} de ~0,8 e inoculadas por perfuração na superfície abaxial da folha de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Teste realizado em triplicata.

Os vetores de expressão utilizados neste trabalho não afetaram a patogenicidade de *X. citri* o que reforça a funcionalidade da ferramenta para estudos de expressão gênica e estudos de genes relacionados com patogenicidade nesta bactéria.

7 CONCLUSÕES

Sendo o promotor de arabinose de *E. coli* responsivo em *X. citri* e apesar de ter um nível de expressão basal, este possui um controle regulado para ligar e desligar genes. Este controle demonstra ser mais eficiente na fase estacionária, ou aproximadamente entre às 12 e 18h de crescimento, que demonstra ser a fase ideal para observações de fenótipos de depleção gênica. Este promotor em vetor replicativo (neste trabalho) ou em vetor integrativo (dados não mostrados) representou uma importante ferramenta para estudos de depleção de proteínas ligadas à processos essenciais em *X. citri*.

Proteínas ParB são estáveis durante toda a curva de crescimento celular de *X. citri*, refletindo sua importância em processos essenciais na célula como segregação cromossômica e divisão celular.

A superexpressão ou a ausência de ParB retarda a taxa de crescimento, perturba a segregação cromossômica causando sutis alterações morfológicas; Essa perturbação, entretanto, não é letal para *X. citri*;

Proteínas ParB demonstram ter uma função acessória na segregação cromossômica, durante a fase estacionária de crescimento. Ou então, a célula consegue resolver essa perturbação de outras formas, as quais desconhecemos. Entretanto, não descartamos a possibilidade de ParB ser essencial em outras fases do crescimento celular, visto a impossibilidade de deleção de *parB* sem que haja cópia extra do gene em *trans*. De fato, com excessão de *C. crescentus* e *M. tuberculosis* (MOHL e GOBER 1997; SASSETTI et al., 2003), na maioria dos sistemas *par* estudados até o momento, ParB mostra ser uma proteína pontual importante mas não essencial neste processo de particionamento (BARTOSIK et al., 2004, 2009; IRETON et al., 1994; JAKIMOWICZ et al., 2007; LEE et al., 2003; LEWIS et al., 2002)

Em *X. citri* ter proteínas ParB alteradas é mais prejudicial do que não tê-las, visto que a disrupção de *parB* altera a sua morfologia, resultando em expressivos efeitos pleiotrópicos como filamentação (5%), células anucleadas (30%) e perda de motilidade e virulência (UCCI et al., 2014); Já a deleção limpa de *parB* (neste trabalho) produziu efeitos mais sutis, o que nos faz sugerir que a presença de uma proteína ParB alterada é mais prejudicial à *X. citri* do que a ausência desta e que embora *X. citri* demonstre ter um padrão de segregação cromossômica semelhante ao de *C. crescentus* (UCCI et al., 2014), ParB parece

ter uma função acessória importante mas não essencial, como é em *C. crescentus* (MOHL et al., 2001).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, A. M. et al. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.3, p292-294, 2004.
- BARTOSIK, A. A. et al. ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with its partner ParA and its target *parS* and specific effects on bacterial growth. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 20, p. 6983-6998, 2004.
- BARTOSIK, A. A. et al. ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. **Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 1080-1092, 2009.
- BARTOSIK, A. A. et al. Transcriptional profiling of ParA and ParB mutants in actively dividing cells of an opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e87276, 2014.
- BELASQUE, Jr. et al. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 314-317, 2010.
- BIGNELL, C. ;THOMAS, C. M. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. **Journal of biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 1-34, 2001.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O biológico**, v. 23, n. 10, 1957.
- CHAGAS, M. C. M. et al. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv citri in Brazil. **Neotrop. Entomol**, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.
- DA SILVA, A. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002.
- DANIELS, M. J. et al. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **Embo** v. 3, n. 13, p. 3323, 1984.
- DEMYTTENAERE, J. ;KIMPE, J. **Mol. Catal. B: Enzym.** 11: 265, 2001.
- DO AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico-Embrapa**, 86, 2003.
- DONOVAN, C. et al. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 13, p. 3441-3451, 2010.
- DUNGER, G. et al. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Arch Microbiology**, v. 188, n. 2, p. 127-135, 2007.

DUNGER, G. et al. Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. citri effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 8, p. 865-876, 2012.

FERREIRA, H. et al. Electrotransformation in three pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Appl. Microbiology Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 651-655, 1995.

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>> Acesso em: 10/02/2015.

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

GOTTWALD, T. R. ;GRAHAM, J. H. ;SCHUBERT, T. S. The pathogen and its impact. **Plant Health Progress** v. 10, 2002.

GULLY D. et al. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. **FEBS Letters** v. 548, n. 1, p. 90-96, 2003.

GUZMAN L. M. et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4121-4130, 1995.

GUZZO, C. R. 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.

HUANG, T. P. ;LU, K. M. ;CHEN, Y. H. 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.

IRETON, K. ; GUNTHER, N. W. ;GROSSMAN, A. D. ; spoOJ Is Required for Normal Chromosome Segregation as well as the Initiation of Sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 17, p. 5320-5329, 1994.

JAKIMOWICZ, D. et al. Characterization of the mycobacterial chromosome segregation protein ParB and identification of its target in *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 4050-4060, 2007.

KANG, Y. et al. Quantitative immunoXuoescence of regulated *eps* gene expression in single cells of *Ralstonia solanacearum*. **Appl Environ Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2356-2362, 1999.

KRAISELBURD, I. et al. A LOV protein modulates the physiological attributes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri relevant for host plant colonization. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38226, 2012.

- LAIA, M. L. et al. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 12, 2009.
- LASOCKI, K. et al. Deletion of the *parA* (*soj*) Homologue in *Pseudomonas aeruginosa* Causes ParB Instability and Affects Growth Rate, Chromosome Segregation, and Motility. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 15, p. 5762-5772, 2007.
- LEE, P. S. ; GROSSMANN, A. D. The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology** v. 60, n. 4, p. 853-869, 2006.
- LEWIS, R. A. et al. Chromosome loss from *par* mutants of *Pseudomonas putida* depends on growth medium and phase of growth. **Microbiology**, v. 148, n. 2, p. 537-548, 2002.
- LI, J. ; WANG, N. 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.
- LIN, D.C.; GROSSMAN A.D. Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. **Cell** 92: 675-685, 1998.
- LIVNY, J. ;YAMAICHI, Y. ;WALDOR, M. K. Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics. **Journal Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8693-8703, 2007.
- MALAMUD, F. et al. HrpM is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 9, p. 1010-1018, 2012.
- MARTINS, P. P. M. et al. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, n. 1, p. 76-83, 2010.
- MIERZEWSKA, J. ;BURDZY, G. Prokaryotic ParA-ParB-*parS* system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. **Elsevier**, v. 67, n. 1, p. 1-14, 2012.
- MILIND, S. L. Preharvest factors affecting fruit quality and postharvest life. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, v. 2, p. 2768-2774, 2003.
- MOHL, D. A. ;GOBER, J. W. Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 675-684, 1997.
- MOHL, D. A. ;EASTER Jr, J. ; GOBER, J. W. The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology** v. 42, n. 3, p. 741-755, 2001.
- NESSER, W. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. **FEMS Microbiol Rev** 26:355-374, 2002.

- NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. 2010. **Disponível em:** < [http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao Marcos Fava evento valor. pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/Apresentacao%20Marcos%20Fava%20evento%20valor.pdf)>. Acesso em, v. 4, 2013.
- PTACIN, J. L. et al. A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 8, p. 791-798, 2010.
- PUIG, O. 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**, v. 24, p. 218-229, 2001.
- SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ;MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- SASSETTI, C. M.; BOYD, D. H.; RUBIN, E. J.; Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 77-84, 2003.
- SCHAAD, N. W. et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Syst Appl Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 494-518, 2005.
- SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst Appl Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.
- SCHLEIF, R. et al. Regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 12, p. 559-565, 2000.
- SGRO, G. G. et al. Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to pathogen virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 9, p. 1047-1059, 2012.
- SELZNICK, B. A invenção de Hugo Cabret. **Editora Lafonte**, 2007.
- SHEPPARD, D. ; ENGLESBERG, E. Further evidence for positive control of the L-arabinose system by gene *araC*. **Journal of molecular biology**, v. 25, n. 3, p. 443-454, 1967.
- SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. **Silpakorn University International Journal**, v. 3, n. 1-2, p. 206-228, 2003.
- SUKCHAWALIT, R. et al. Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in *Xanthomonas*. **FEMS microbiology letters**, v. 181, n. 2, p. 217-223, 1999.
- THANBICHLER, M. ; SHAPIRO, L. ; MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 147-162, 2006.

UCCI, A. P. et al. Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **Microbiologyopen**, v. 3, n. 1, p. 29-41, 2014.

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

VOJNOV A. A. et al. Expression of the *gum* operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 6, p. 768-774, 2001.

YAN, Q. ; WANG, N. 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.

YAN, Q. ; HU, X. ; WANG, N. ; The novel virulence-related gene *nlxA* in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 8, p. 923-934, 2012.

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