

UNESP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia

**Funcionalidade das proteínas ParA e
ParB na segregação cromossômica
de *Xanthomonas citri* ssp. *citri***

Amanda Piovesan Ucci

Tese de Doutorado

**Araraquara - SP
2014**

Amanda Piovesan Ucci

**Funcionalidade das proteínas ParA e
ParB na segregação cromossômica de
Xanthomonas citri ssp *citri***

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista –
UNESP, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutora em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.**

Orientador: Henrique Ferreira

**Araraquara – SP
2014**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

U16f

Ucci, Amanda Piovesan

Funcionalidade das proteínas ParA e ParB na segregação cromossômica de *Xanthomonas citri* ssp *citri* / Amanda Piovesan Ucci. – Araraquara, 2014
120 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Henrique Ferreira

1. *Xanthomonas citri*. 2. Segregação cromossômica. 3. Divisão celular I. Ferreira, Henrique, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

“A curiosidade é mais importante
do que o conhecimento.”

Albert Einstein

Dedicatória

**Aos meus pais, Ana e Jorge
e a minha irmã Luana, pelo
suporte durante todos esses anos.**

Agradecimentos

A minha família Ana, Luana e Jorge pelo apoio e incentivo diário o qual foi de extrema importância durante essa jornada. Obrigada por me esperarem voltar do laboratório aos domingos para almoçarmos juntos, por gostarem de *Xanthomonas* quase tanto quanto eu e por hoje saberem que Xac possui a proteína ParB.

Ao Henrique Ferreira pela oportunidade, orientação e discussões que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Belasque, pela contribuição nessa pesquisa e pelo ombro amigo.

As minhas amigas Isabel Silva e Julia Sumares por estarem sempre presentes, tanto em discussões científicas quanto em pessoais, pela participação neste trabalho e pelas tantas risadas de doerem a barriga. Sem vocês esses quatro anos não teriam sido tão produtivos e divertidos ao mesmo tempo.

Aos professores Cleslei Fernando Zanelli e Alexandra Ivo de Medeiros por estarem sempre prontos em ajudar.

Ao Pedro Garcia Marsílio pelo amor e companheirismo, por compreender minhas ausências, por desenhar bolinhas verdes e chamá-las de ParB.

As colegas de laboratório Paula Martins, Teresa Cofre e Daniele Pivetta, pela companhia.

Ao Patrick Viollier, da Universidade de Genebra, pela colaboração, confiança, e ensinamentos. Hope to see you soon.

A Silvia Ardissonne por tudo o que me ensinou, pela paciência e pela agradável presença. Grazie Djindjola, a presto!

Ao Antonio Frandi (ciao zio) e Johann Mignolet pela ajuda na interpretação dos resultados de ChIP-Seq e Tn-Seq.

Aos colegas do laboratório do Patrick: Coralie Fumeaux, Stefano Sanselicio, Daniel Martins, Clare Kirkpatrick, Gaël Panis e Laurance Théraulaz, pela ajuda e por terem proporcionado um ambiente de trabalho extremamente agradável.

Aos membros do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, à Pós-Graduação e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Fapesp pelo apoio financeiro.

RESUMO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é o agente etiológico do cancro cítrico, uma doença severa que afeta plantas de citros em todo o mundo e para a qual não há uma forma eficaz de controle. A obtenção do genoma de Xac sem dúvida representou um marco nos estudos deste microrganismo, porém, muito pouco ainda se sabe sobre alguns de seus processos essenciais como replicação e segregação do material genético, septação, divisão e crescimento celular. A segregação cromossômica é um processo essencial em todas as células vivas. Esse processo envolve uma precisa replicação e particionamento do cromossomo para garantir uma fiel transmissão da informação genética para as células filhas. Esses mecanismos veem sendo extensivamente caracterizados em eucariotos, porém ainda não são muito bem compreendidos em procariotos. Contudo, relatos recentes mostraram que bactérias possuem um sistema tipo mitótico no qual a sequência *parS* é ligada a ParB e puxada por ParA durante a segregação cromossômica. Nesse trabalho foi identificado e caracterizado um ativo sistema tipo ParAB/*parS* no fitopatógeno Xac. Várias evidências moleculares e citológicas indicam que ParAB/*parS* está envolvido no particionamento cromossômico de Xac: i) ParB-GFP localiza-se em um único cluster nas bordas do nucleóide; ii) ParB pode interagir com sequências de ligação *parS in vitro* e *in vivo* e realizar spreading lateral, sugerindo a formação de um complexo centromérico ParB/*parS*; iii) a dinâmica de ParB/*parS* sugere um modelo assimétrico de segregação cromossômica em Xac; iv) enquanto a super expressão de ParA e ParB não alteram a morfologia celular, mutações em *parB* acarretam na filamentação celular, formação de células em cadeias e sem nucleóide, prejudicando a segregação cromossômica e/ou divisão celular; v) a localização subcelular de ParB-GFP e ZapA-mCherry evidenciam o envolvimento entre segregação cromossômica e divisão celular em Xac; vi) ParA-GFP localiza-se como foci bipolar ou de maneira linear pela célula, (quando estão associadas ao DNA) e pode se ligar ao DNA *in vivo*. Notavelmente a disrupção da função de ParB em Xac acarreta na perda da virulência (ausência dos sintomas do cancro cítrico em plantas hospedeiras) e motilidade. Como não há homólogos para as proteínas tipo ParAB em células eucariotas, esse sistema pode ser considerado um potencial alvo para o desenvolvimento de antimicrobianos contra o cancro cítrico, o qual não possui nenhum tratamento viável até o presente momento.

ABSTRACT

The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) is the causal agent of citrus canker, a severe disease that affects citrus plants worldwide. An effective control for the citrus canker is not available yet, and the elimination of infected plants continues to be the recommended practice to control the disease. Although the genome sequence of Xac has been available for almost a decade, its biology is not well known and there is a lack in the literature of studies concerning chromosome segregation and cell division of this plant pathogen. Chromosome segregation is an essential process to all living cells. This process involves a precise replication and partitioning of the chromosome in order to obtain a faithful transmission of hereditary information to the daughter cells. These mechanisms have been extensively characterized in eukaryotes but are still not well understood in prokaryotes. However, recent reports have shown that bacteria have a mitotic-like system in which the *parS* sequence is bound by ParB and pulled by ParA during chromosome segregation. In this work it was identified and characterized an active ParAB/*parS* system in the Xac plant pathogen. Several molecular and cytological evidence indicate that ParAB/*parS* is involved in chromosome partitioning in Xac: i) ParB-GFP localizes into a single cluster at the edges of the nucleoid, as shown for other ParB-like factors; ii) ParB can interact with *parS* binding sites *in vitro* and *in vivo* through a nucleation mechanism followed by lateral spreading, suggesting the formation of a ParB/*parS* centromere-like complex; iii) ParB/*parS* dynamic suggests an asymmetric model of chromosome segregation; iv) whereas the overexpression of both ParA and ParB does not cause any cell morphology defect, a *parB* mutation renders cells filamentous and often anucleate, which suggests impaired chromosome segregation and/or cell division; v) ParB-GFP and ZapA-mCherry (marker for the Z-ring) localization suggests a link between origin segregation and cell division vi) ParA-GFP localizes as bipolar foci or as linear assembly (DNA-bound form) and binds DNA *in vivo*. Remarkably, the disruption of ParB function in Xac led also to a loss of virulence (absence of citrus canker symptoms on host plants) and motility. As ParAB-like proteins have no homologues in eukaryotic cells, this system can be considered a potential target for the development of new antimicrobial agents against citrus canker, for which up to now there is no effective treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas do cancro cítrico	19
Figura 2. Esquema funcional de ParA e modelo estrutural de ParB	24
Figura 3. Modelos de segregação cromossômica em bactérias	27
Figura 4. Atividade do operon <i>parAB</i> de Xac	48
Figura 5. Localização de ParB-GFP	50
Figura 6. Time-lapse de ParB utilizando-se a linhagem Xac <i>parB</i>::pAPU3	52
Figura 7. Deleção de <i>parB</i> no cromossomo de Xac	56
Figura 8. Estratégia de disrupção de <i>parB</i> em Xac	58
Figura 9. Curva de crescimento do mutante Xac <i>parB</i>::pAPU2	60
Figura 10. Mutantes de Xac com disrupção no gene <i>parB</i> mostram eliminação da virulência	61
Figura 11 Fenótipo de filamentação dos mutantes Xac <i>parB</i>	63
Figura 12. Análise morfológica da linhagem Xac <i>parB</i>::pAPU2	64
Figura 13. Localização de ParB-GFP na linhagem Xac <i>parB</i>::pAPU2 pCW510-<i>parB</i>	68
Figura 14. Versões da proteína ParB de Xac	70
Figura 15. Linhagens de Xac e <i>C. crescentus</i> contendo formas truncadas da proteína ParB	71
Figura 16. Mutações sítio-dirigidas em ParB afetam morfologia de Xac	74
Figura 17. Purificação de ParB-His6	76
Figura 18. Cromatografia de exclusão molecular de ParB-His6 purificada	77
Figura 19. Shift de ParB em gel de agarose	79
Figura 20. Sítios de ligação de ParB ao DNA de Xac <i>in vivo</i>	81
Figura 21. Morfologia das linhagens de Xac contendo cópias cromossomais extras de regiões de ligação de ParB	84
Figura 22. Efeitos da mutação de <i>parB</i> na motilidade de Xac	89
Figura 23. Localização de ParB-GFP e ZapA-mCherry em Xac	92
Figura 24. Expressão de ParA, ParB e ParC em Xac	94
Figura 25. Microscopia de fluorescência utilizando a linhagem Xac pCW510-<i>parC</i>.	96
Figura 26. Localização de ParA-GFP em Xac	98
Figura 27. Localização subcelular de versões mutagenizadas de ParA-GFP em Xac	100
Figura 28. Localização subcelular de de ParA-GFP no mutante Xac <i>parB</i>::pAPU2	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Linhagens de bactérias utilizadas neste trabalho	31
Tabela 2.	Plasmídeos utilizados neste trabalho	33
Tabela 3.	Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	35
Tabela 4.	Análise morfológica de <i>Xac parB::pAPU2</i>	65

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
cm	Centímetro
C-terminal	Carboxi-terminal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilidol
DIC	Contraste de interferência diferencial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	Densidade óptica
DSF	Fator de sinalização difusível
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMSA	“Electrophoretic mobility shift assay”
EPS	Exopolissacarídeo
g	Gramas
GFP	“Green Fluorescent Protein”
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Tampão orgânico (<i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(2-ácido etanosulfônico)
His6	Tag de hexahistidina
HTH	Helix turn helix
<i>hrp</i>	“Hipersensibility response to pathogenicity”
HRP	“Horseradish peroxidase”
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodaltons
kb	Quilobases
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LiCl	Cloreto de lítio
M	Molar
mCherry	Proteína monomérica fluorescente
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	Minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Ni ²⁺	Níquel (para purificação em coluna com resina de níquel)
N-terminal	Amino-terminal
nm	Nanômetro
NYGB	Meio de cultura contendo peptona, extrato de levedura e glicerol
ORF	Janela aberta de leitura
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PBS	“Phosphate Buffered Saline” (solução salina tamponada com fosfato)

pH	Potencial hidrogeniônico
PhC	Contraste de Fase
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PYE	Meio de cultura contendo peptona, extrato de levedura, sulfato de magnésio e cloreto de cálcio
PYM	Meio nutriente contendo peptona-extrato de levedura-maltose
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TAP	“Tandem Affinity Purification”
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
Triton X-100	Polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Luz ultra-violeta
V	Volts
xg	Aceleração gravitacional
Xac	<i>Xanthomonas citri</i> ssp <i>citri</i>
WT	Selvagem
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
°C	Graus Celsius
Å	Angstrom
~	Aproximadamente

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
ABREVIATURAS	12
INTRODUÇÃO	17
A citricultura e o cancro cítrico	18
O genoma de Xac.....	20
Segregação cromossômica em bactérias.....	21
HIPÓTESE A SER TESTADA	28
OBJETIVOS	28
MATERIAL E MÉTODO	29
Linhagens bacterianas e plasmídeos	30
Clonagens	30
Mutações sítio-dirigida.....	37
Deleção de <i>parB</i>	38
DNA, RNA e proteínas	39
Expressão de proteínas	39
SDS-PAGE e Western blotting.....	40
Purificação de ParB-His6	41
Gel shift	41
Microscopia de fluorescência.....	42
Cuva de crescimento.....	42
Testes de patogenicidade	42
Imunoprecipitação da cromatina (ChIP) seguida de sequenciamento em larga escala (ChIP-Seq)	43
Inserções de transposon no genoma (Tn) seguida de sequenciamento em larga escala (Tn-Seq).....	44
Motilidade	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
ParB é expressa em Xac.....	47
Localização subcelular de ParB-GFP	49
Deleção de <i>parB</i> afeta viabilidade celular em Xac	54
Disrupção de <i>parB</i> elimina virulência em Xac.....	59
Disrupção de <i>parB</i> altera morfologia de Xac	62
ParB de Xac possui atividade semelhante a ParB de <i>C. crescentus</i>	67
Mutações pontuais em <i>parB</i> alteram a morfologia de Xac	72
Propriedades de ligação ao DNA de ParB de Xac.....	75
ParB interage com a região de origem do cromossomo de Xac <i>in vivo</i>	80
Cópias extras de <i>parS</i> prejudicam a divisão celular em Xac	82
Interações genéticas de ParB	85
Disrupção em <i>parB</i> altera motilidade em Xac	88
Segregação cromossômica e divisão celular são mecanismos ligados em Xac	90
ParA e ParC são expressas em Xac	91
Localização de ParA em Xac	95

ParA interage com moléculas de DNA <i>in vivo</i>	101
CONCLUSÃO	105
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A citricultura e o cancro cítrico

O Brasil é atualmente o maior produtor de laranjas do mundo e é responsável pela exportação de cerca de 85% de sua produção. Este é um mercado que proporciona a entrada de mais de US\$ 2 bilhões/ano no Brasil, já que grande parte da produção destina-se à exportação. O maior destaque vai para a produção de suco concentrado de laranja, já que a fruta *in natura* dificilmente atinge os parâmetros fitossanitários necessários para a entrada nos mercados estrangeiros. Esta dificuldade decorre do fato de que o Brasil ainda não é considerado um país livre de doenças importantes e potencialmente devastadoras como o cancro cítrico (Neves et al. 2001; Neves et al., 2010).

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (Xac), sendo responsável pela forma asiática ou cancrose do tipo A, que constitui a forma mais severa da doença e que acomete todas as variedades e espécies comerciais de citros, representando um dos mais graves problemas para esta cultura ao redor do mundo. Introduzida no Brasil em 1957 na região de Presidente Prudente, esta bactéria é altamente contagiosa, podendo resistir no ambiente como epífita, sendo dispersa naturalmente pelo vento ou chuva e podendo penetrar na planta por qualquer tipo de abertura, inclusive pelos estômatos. Um dos fatores que pode favorecer a disseminação do cancro cítrico a partir de plantas doentes é a larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariida), cuja constatação no país se deu em março de 1996 na região de Limeira (SP) e que rapidamente se espalhou pelo país (Chagas, 1999).

Os sintomas do cancro cítrico constituem-se por lesões circulares, corticosas e salientes, de coloração marrom e aspecto eruptivo, ocorrendo em folhas, ramos e frutos, como pode ser observado na Figura 1. Nas folhas e frutos é comum o aparecimento de um halo amarelo circundando a área necrosada. Em estágios mais avançados, pode ocorrer também a perda de folhas e queda de frutos (Das, 2003; Stall, 1983).

Como medida de controle do cancro faz-se a erradicação de plantas doentes e suspeitas de contaminação, já que não existe um controle químico eficaz que elimine

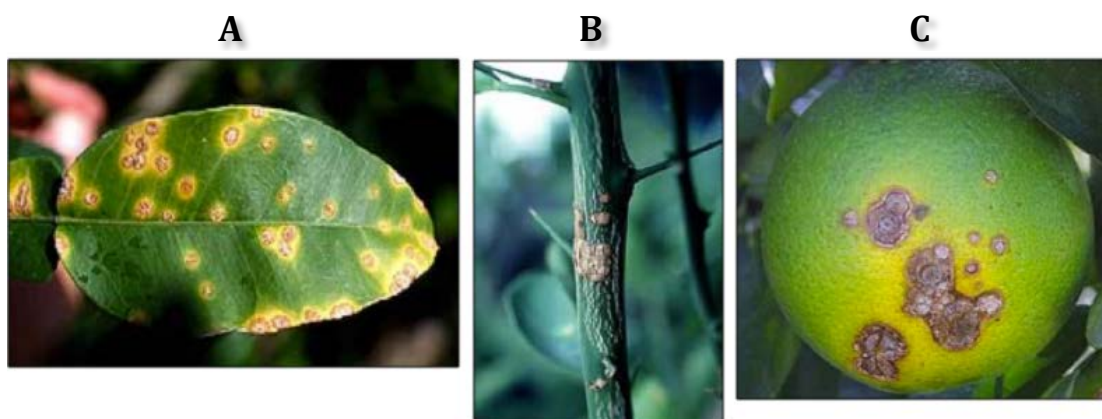


Figura 1. Sintomas do cancro cítrico. A) Lesões em folhas de citros (red grapefruit) cercada pelo halo amarelo (clorose) B) Lesão em ramo de laranja doce C) Lesão em fruto imaturo de citros (Gottwald et al., 2002).

completamente o agente etiológico Xac. O cancro cítrico é endêmico no estado da Flórida, EUA, uma das principais áreas de produção de citros. Na Flórida, o programa de erradicação foi abolido em 2006, e como consequência o cancro cítrico se espalhou pela região. Por outro lado, o Estado de São Paulo ainda mantém o programa de erradicação para uma eliminação obrigatória de foci da doença, contudo, devido a diminuição do esforço para a detecção e erradicação de plantas infectadas, o cancro cítrico tem se tornado epidêmico (Ferreira & Belasque, 2011).

O genoma de Xac

Devido à importância econômica do cancro cítrico, e num esforço para acelerar o conhecimento da biologia do agente etiológico desta doença, Xac teve seu genoma completamente sequenciado. O isolado sequenciado da bactéria possui um cromossomo circular com aproximadamente 5.2 Mb e dois plasmídeos: pXAC33 e pXAC64 contendo 33.699 e 64.920 bases, respectivamente. Isto equivale a praticamente o dobro do genoma da primeira bactéria fitopatogênica a ser sequenciada *Xylella fastidiosa* (Xf-CVC), um patógeno de citros aparentado à *Xanthomonas*, ambos pertencentes à subdivisão γ das proteobactérias (da Silva et al., 2002, Simpson et al., 2000).

A anotação do genoma de Xac revelou 4.313 ORFs das quais 2.710 codificam para produtos homólogos a proteínas já conhecidas. Muitas destas estariam relacionadas à patogenicidade, como os genes que codificam para enzimas extracelulares (celulases, pectinases e hemicelulases) as quais são liberadas pelo sistema de secreção do tipo II (em duplicata no genoma). Também foram encontrados genes que codificam para o sistema de secreção do tipo III (genes *hrp* que injetam as proteínas de avirulência no interior da célula hospedeira) e para o sistema secretório do tipo IV (relacionado a processos de conjugação), além de genes para produção e resistência a toxinas, síntese de exopolissacarídeos (EPS), proteínas de membrana e outras relacionadas a processos de adaptação a condições adversas, como choque térmico, por exemplo. Além deste arsenal para produção de doença, 1.601 ORFs anotadas permanecem sem função conhecida (proteínas hipotéticas) e, dentre elas, 1.272 (cerca de 30% do genoma) apresentam homologia a ORFs hipotéticas de outros

organismos, sendo consideradas, portanto, ORFs hipotéticas conservadas. A categoria de ORFs codificando para produtos desconhecidos em bactérias perfaz, sem sombra de dúvidas, uma das classes mais numerosas de ORFs, onde se espera encontrar uma vasta quantidade de informações referentes à adaptação e patogenicidade. Existem atualmente mais de 1000 espécies bacterianas com seus genomas disponíveis em bancos de dados mundiais e o número de proteínas hipotéticas a serem caracterizadas é crescente (em torno de 30-40% dos genomas). Bactérias possuem genomas compactos e apresentam normalmente redução/perda de regiões codificadoras associadas à adaptação a nichos restritos (Ochman & Davalos, 2006). Seria realmente improvável que bactérias pudessem dedicar praticamente metade de seus genomas a sequências desnecessárias e que toda diferença entre espécies e gêneros fosse concentrada em regiões conhecidas. Bem mais provável é que o nosso conhecimento a respeito das funções destas ORFs hipotéticas abra novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade e especialização destas bactérias para infectar diferentes hospedeiros, resultando em novas possibilidades de controles de doenças como o cancro cítrico.

Apesar do genoma da Xac ter sido publicado em 2002 há na literatura poucos trabalhos sobre a caracterização de processos biológicos essenciais desta bactéria como a segregação cromossômica, divisão celular e crescimento.

Segregação cromossômica em bactérias

Por décadas e décadas acreditou-se que as células procarióticas eram desprovidas de estruturas semelhantes ao citoesqueleto de eucariotos e que a forma era mantida e governada somente pela presença da parede celular. Além disto, fatores que atuam ativamente na segregação dos cromossomos, após duplicação, e na divisão celular eram desconhecidos, ou pobremente caracterizados. Contudo, a aplicação de técnicas de microscopia antes utilizadas somente para eucariotos tem alterado este cenário. Hoje sabe-se que bactérias possuem estruturas semelhantes a polímeros de tubulinas responsáveis pela formação de septo e divisão celular, possuem filamentos semelhantes à actinas que atuam na manutenção da forma, posicionamento de estruturas dentro da célula e crescimento da parede celular, apresentam estruturas

análogas aos filamentos intermediários de eucariotos e finalmente, complexos proteicos que atuam ativamente na segregação de cromossomos garantindo uma eficiente partição do material genético (Ausmees et al., 2003; Daniel & Errington, 2003; Doi et al., 1988; Gitai et al., 2005a; Jones et al., 2001; Lin & Grossman, 1998; Lutkenhaus et al., 1980; Murray et al., 2006).

Há relativamente pouco tempo, propunha-se que o cromossomo bacteriano permanecia ligado a algum sítio no interior das células e que a segregação deste se dava de forma passiva e de acordo com o crescimento e a alongação celular. Entretanto, foi demonstrado que a taxa de movimento dos cromossomos em *Bacillus subtilis* era da ordem de 0,17 mm/min, enquanto que a de alongação celular era <0,025 mm/min, uma observação que, entre outras, leva à proposição de segregação ativa (Glaser et al., 1997; Sharpe & Errington, 1999; Webb et al., 1998). Posteriormente, demonstrou-se que a maquinaria de replicação cromossômica em *Escherichia coli* e *B. subtilis* permanecia estacionada no centro do bastonete e que cromossomos eram puxados por este complexo, replicados e expulsos para os pólos (Lau et al., 2003; Lemon & Grossman, 1998; Lemon & Grossman, 2001; Webb et al., 1997). Tal fato levou à proposição do modelo de captura-extrusão das origens e a força da replicação seria um componente efetor da segregação (Lemon & Grossman, 2001). Uma contribuição da maquinaria de transcrição foi também proposta, onde genes estariam orientados de forma a gerar força a favor da expulsão das origens para os pólos quando da ocorrência de suas transcrições (Dworkin & Losick, 2002). Em suma, a segregação cromossômica em bactérias ocorre de forma ativa.

Bactérias devem segregar o novo cromossomo replicado antes da divisão celular para garantir uma fiel transmissão do material genético para as células filhas. A maquinaria de segregação foi inicialmente estudada em sistemas plasmidiais, pois plasmídeos de baixo número de cópias utilizam mecanismos específicos para se manterem estáveis na população bacteriana. O movimento de plasmídeos marcados com proteínas fluorescentes, durante a segregação cromossômica, pode ser observado por microscopia de fluorescência. Assim, o apparatus responsável pela separação de plasmídeos foi descrito em dois sistemas de partição plasmidial denominados Tipo I e Tipo II, sendo que o sistema de particionamento plasmidial do Tipo I é o mais comum (Ebersbach & Gerdes, 2005; Ghosh et al., 2006; Salje et al., 2010). Um exemplo destes mecanismos é representado pelo loci *par* (partitioning protein), que assegura uma distribuição igualitária das cópias plasmidiais para as células filhas durante o

processo de divisão celular (Gerdes et al., 2010). Várias proteínas homólogas ao sistema de particionamento plasmidial tipo ParAB/*parS* foram posteriormente descobertas em sistemas de segregação do cromossomo bacteriano (Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012). O locus *parABS* é conservado entre bactérias e está localizado ao redor da região de origem do cromossomo, *oriC* (Livny et al., 2007). A composição desse sistema compreende uma sequência *cis* próxima a região centromérica do DNA, denominada *parS*; proteínas tipo ParA, que são ATPases capazes de formar filamentos que se estendem na célula de pólo a pólo e, finalmente, por proteínas tipo ParB, que atuam como mediadoras do processo devido a habilidade de se ligar a *parS* (Fogel & Waldor, 2006; Ptacin et al., 2010; Schofield et al., 2010). Ptacin et al. (2010) propuseram um modelo funcional hierárquico para ParA de *Caulobacter crescentus*, em que primeiramente esta proteína deve-se ligar a moléculas de ATP para a seguinte mudança conformacional da molécula e subsequente dimerização. Posteriormente, estimulada pela ligação com ParB, ocorre a hidrólise de ATP ou troca de nucleotídeos dos dímeros de ParA permitindo a liberação de ADP e despolimerização dos filamentos proteicos que foram formados, para deste modo, recomeçar um novo ciclo a partir dos monômeros liberados (Figura 2A). ParB, por sua vez, quando ligada a sequências centroméricas, reúnem outras moléculas de ParB formando estruturas nucleoproteicas chamadas de complexos de partição. A agregação destes componentes garante que moléculas de DNA sejam segregadas durante o processo de particionamento. Para isso, específicos domínios e motivos de proteínas tipo ParB são requeridos durante o mecanismo de segregação (Figuras 2B e 2C).

Uma separação precisa dos cromossomos recém-duplicados em *B. subtilis* pode ser perturbada por mutações de alguns genes que codificam para proteínas apresentando homologia com fatores de partição plasmidial tipo ParA e ParB (Leonard et al., 2005). Como exemplo, mutação no gene cromossomal *spo0J* em *B. subtilis* (Spo0J – *sporulation protein* – uma proteína tipo-ParB) promove aumento detectável no número de células anucleadas, implicando o envolvimento da proteína Spo0J na segregação cromossômica desta bactéria (Ireton et al., 1994). Também foi demonstrado que Spo0J recruta SMC (proteína de manutenção da estrutura cromossômica) para a região da origem em *B. subtilis* e na sua ausência, tal fator, que contribui para a segregação cromossômica, teria sua função perturbada (Gruber & Errington, 2009).

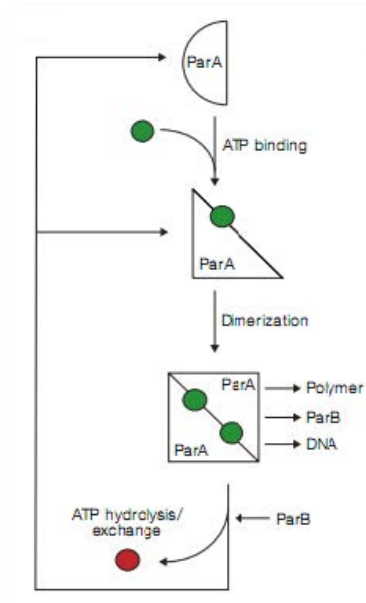
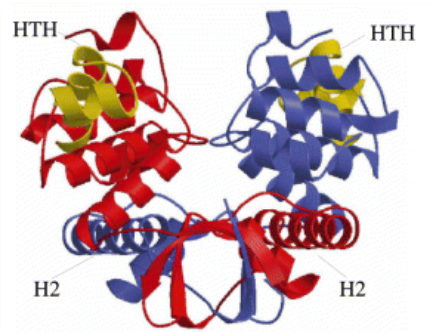
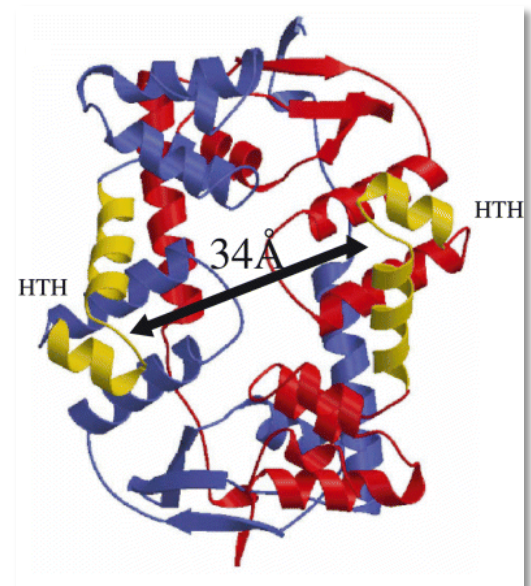
A**B****C**

Figura 2. Esquema funcional de ParA e modelo estrutural de ParB. A) Caminho bioquímico da proteína ParA de *C. crescentus* (Ptacin et al., 2010). B) e C) Dímeros de Spo0J de *T. thermophilus*. Motifs Helix turn helix (HTH) estão representados em amarelo e regiões α -hélice em N-terminal estão representadas em vermelho (H2). A distância entre os dois motifs HTH na molécula dimérica é de 32Å (Leonard et al., 2004).

Em microscopia de fluorescência observou-se que Spo0J-GFP co-localiza com a origem de replicação em *B. subtilis* formando uma estrutura compacta (complexo nucleo-proteico) com função provável de organização de uma região centromérica análoga àquelas encontradas em eucariotos (Autret et al., 2001; Glaser et al., 1997; Marston & Errington, 1999; Sharpe & Errington, 1998). A organização desta região centromérica em *B. subtilis* parece depender de um segundo fator denominado Soj (Marston & Errington, 1999). Soj (supressor of Spo0J) é uma ATPase da família ParA com função na esporulação de *B. subtilis* (supressor da atividade de spo0J) e que atualmente vem sendo implicada na regulação de iniciação de replicação cromossômica numa atividade controlada por Spo0J (Murray & Errington, 2008). Entretanto, mutação em *soj* não produz nenhuma alteração detectável na segregação (Ireton et al., 1994). Há fenótipo, entretanto, na segregação do material genético durante formação do esporo em mutantes combinados *racA-soj*, em que células parecem perder a capacidade de orientação da região que contém *oriC* para o esporo em formação (Wu & Errington, 2003). Finalmente, nenhuma destas proteínas é essencial em *B. subtilis*, em que a segregação cromossômica provavelmente pode contar com diversos sistemas redundantes para a mesma finalidade.

Em suma, as proteínas tipo-ParB organizam complexos centroméricos se ligando a diversos sítios distribuídos ao redor da origem de replicação (Lin & Grossman, 1998). Ao se ligar ao DNA, Spo0J forma complexos nucleo-proteicos gigantes espalhando (“spreading”) para os arredores de cada sítio (filamentos Spo0J-DNA) (Murray et al., 2006) e recruta SMC que também operaria no processo de separação/organização cromossômica (Gruber & Errington, 2009). Algo em torno de 10 sítios ou complexos Spo0J/DNA coalescem para formar um focus compacto que pode ser visto em microscopia de fluorescência utilizando-se Spo0J-GFP, uma estrutura dependente de Soj (Marston & Errington, 1999). Soj por sua vez poderia monitorar o status da replicação/segregação integrando, de certa forma, esta informação e a decisão de entrada ou não em esporulação. Em apoio a esta observação, foi demonstrado que ParB de *T. thermophilus* (análogo de Spo0J) estimula a atividade ATPásica de ParA (semelhante a Soj) *in vitro* e na ausência de Spo0J, Soj acumula no interior da célula na forma ligada a ATP, que estimula replicação de DNA via DnaA e que culminaria na inibição de esporulação (Leonard et al., 2005; Murray & Errington, 2008). Pode-se dizer, de acordo com os dados

descritos para Spo0J e Soj de *B. subtilis*, que este microrganismo possui um modelo simétrico de segregação cromossômica (Figura 3A).

Já em *C. crescentus*, cuja replicação é iniciada apenas uma vez por ciclo celular, existe a dependência das proteínas ParA e ParB para a viabilidade celular (Mohl et al., 2001). Nessa bactéria dimórfica, ParB se liga a *parS*, sequência adjacente a região de origem, dando origem ao complexo centromérico, que por sua vez é ancorado em um dos pólos celulares pela proteína PopZ (pole organizing protein, proteína polimérica requerida para a fiel segregação cromossômica) (Figge et al., 2008; Toro et al., 2008). ParA que está presa ao novo polo por TipN é estendida até o polo oposto e puxa uma cópia do cromossomo através da sua retração e interação com o complexo ParB/*parS* (Ptacin et al., 2010), resumindo um modelo assimétrico de segregação cromossômica (Figura 3B).

Outros fatores participantes do modelo de segregação seriam estruturas do citoesqueleto formadas por proteínas tipo-actinas (MreB). MreB e relativos, que atuam na manutenção da forma em bactérias e no crescimento longitudinal destas (Carballido-Lopez & Formstone, 2007; Daniel & Errington, 2003; Graumann, 2007), foi implicada, pelo menos em *C. crescentus*, com a orientação das origens para os pólos celulares tão logo a duplicação tenha ocorrido (Gitai et al., 2005b). Mais recentemente, demonstrou-se que assim que origens adentrem a região polar em *C. crescentus* há captura destas por uma rede formada pela proteína PopZ (Ebersbach et al., 2008). Em *B. subtilis* o receptor polar, pelo menos durante o processo de esporulação, seria a proteína DivIVA (Wu & Errington, 2003).

Xac possui em seu genoma ORFs identificadas como *parA* e *parB* e um putativo sítio *parS* (da Silva et al., 2002; Livny et al., 2007) entretanto, não havia sido relatado até então que tais genes são expressos e que Xac utiliza o sistema ParAB/*parS* para a manutenção da integridade de seu cromossomo. No presente trabalho, portanto, foi investigado a utilização de tal sistema na correta partição do material genético em Xac.

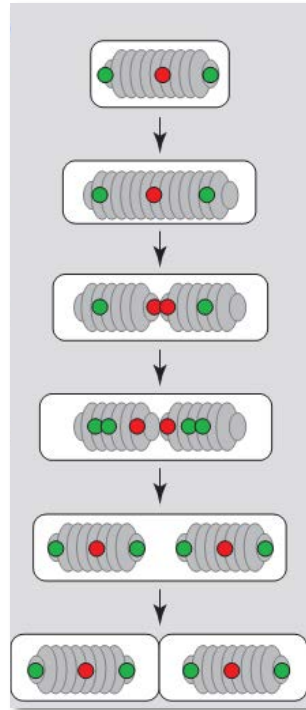
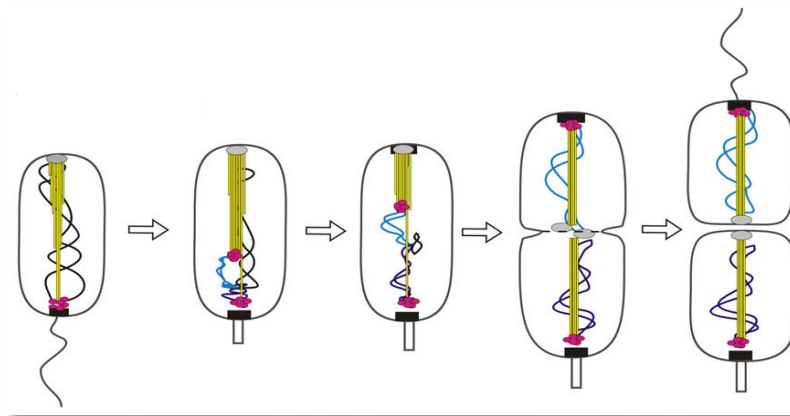
A**B**

Figura 3. Modelos de segregação cromossômica em bactérias. A) Segregação cromossômica simétrica descrita em *B. subtilis*. Após replicação do DNA, regiões de término *terC* (vermelho) e origem *oriC* são duplicadas (verde) e bidirecionalmente separadas em direção ao polo celular (Sharpe & errington, 1999). B) Segregação cromossômica assimétrica descrita em *C. crescentus*. Filamentos retráteis de ParA (amarelo), ancorados por TipN (cinza) orientam o complexo ParB/parS (cor de rosa), inicialmente ancorado por PopZ (preto), em direção ao novo polo (Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012).

HIPÓTESE A SER TESTADA

Se *Xanthomonas citri* ssp. *citri* possui um sistema de partição funcional e manutenção da integridade cromossômica semelhante ao sistema tipo ParAB/parS.

OBJETIVOS

Geral: testar a funcionalidade das proteínas ParA e ParB potencialmente codificada por Xac.

Específicos:

1. Verificar a expressão de ParA e ParB de Xac através da cauda TAP (ParA-TAP e ParB-TAP).
2. Estudar a função de ParAB por microscopia de fluorescência em Xac.
3. Estudar a função de *parS* através da provável interação ParB/*parS*.
4. Disrupção gênica de *parB*: identificar possíveis alterações na replicação, segregação cromossômica, patogenicidade e motilidade e verificar se é essencial em Xac.
5. Caracterização bioquímica de ParB: verificar o sítio de ligação ao DNA e se a proteína tem fenótipo de “spreading” lateral.
6. Confirmar as funções de ParAB através de proteínas mutagenizadas.

MATERIAL E MÉTODO

Linhas bacterianas e plasmídeos

As linhagens utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1, os plasmídeos na Tabela 2 e os oligonucleotídeos na Tabela 3.

As linhagens de *E. coli* DH10B, EC100 e BL21 (DE3) pLysS foram cultivadas a 37°C em meio LB (Sambrook et al., 1989). A linhagem Xac 306 utilizada no presente estudo foi a sequenciada por da Silva et al. (2002). Xac foi anteriormente denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, tendo sido re-classificada por (Schaad, et al., 2005, Schaad, et al., 2006). Xac foi cultivada a 30°C em meio LB ou PYM (Siciliano et al., 2006) com ou sem ágar (Daniels, et al., 1984). *C. Crescentus* NA1000 foi cultivada a 30°C em meio PYE (Ely, 1991). Antibióticos foram utilizados quando necessário (*E. coli*: ampicilina 100 µg/mL, canamicina 20 µg/mL, gentamicina 25µg/mL, cloranfenicol 20µg/mL; Xac: ampicilina 100 µg/mL, canamicina 20 µg/mL, gentamicina 10 µg/mL, cloranfenicol 12,5 µg/mL; *C. crescentus*: gentamicina 5 µg/mL).

Clonagens

Para a construção do vetor de expressão pHF5Ca (FJ562210) contendo TAP-tag foi substituído o cassete *gfpmut1* do vetor pPM2a (Martins et al., 2010) pelo cassete *tap1479* que foi amplificado do vetor pBS1479 (Puig et al., 2001) utilizando os oligonucleotídeos PBS1479F/R. *gfpmut1* foi liberado do vetor pPM2a através de digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I enquanto o cassete *tap1479* foi tratado com as mesmas enzimas. Os fragmentos foram quantificados e submetidos a reações de ligação por 16h a 16°C.

O vetor de expressão pAPU1 foi construído para a expressão de ParB-TAP. Para este ensaio, *parB* foi amplificado por PCR a partir de DNA cromossomal de Xac como molde e utilizando o par de oligonucleotídeo ParBF20070822 e ParBR20080530, ambos contendo sítios de restrição reconhecidos pela enzima *Bam*HI. Desse modo, inserto e vetor (pHF5Ca) foram submetidos a uma reação de

Tabela 1. Linhagens de bactérias utilizadas neste trabalho

Linhagens	Características relevantes	Referência
<i>E. coli</i> DH10B	Linhagem utilizada para clonagens	Invitrogen
<i>E. coli</i> EC100	Linhagem utilizada para clonagens	Epicentre
<i>E. coli</i> S17	Linhagem utilizada para conjugação	Biomedal
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Linhagem utilizada para expressão proteica (sistema pET), Chl ^R	Novagen
<i>C. crescentus</i> NA1000	<i>C. crescentus</i> NA1000 WT	Marks et al., 2010
Xac 306	Xac WT, Ap ^R , IBSBF 1594	da Silva et al 2002
Xac amy::pAPU1	pAPU1 integrado no locus <i>amy</i> de Xac, Ap ^R , Km ^R	Ucci et al, 2014
Xac parB::pAPU1	pAPU1 integrado no locus <i>parB</i> de Xac, Ap ^R , Km ^R	Ucci et al, 2014
Xac parB::pAPU2	pAPU2 integrado no locus <i>parB</i> de Xac, Ap ^R , Km ^R	Ucci et al, 2014
Xac parB::pAPU3	pAPU3 integrado no locus <i>parB</i> de Xac, Ap ^R , Km ^R	Ucci et al, 2014
Xac parB::pAPU4	pAPU4 eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Km ^R	Este trabalho
Xac pCW510-parA	pCW510-parA eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pCW510-parB	pCW510-parB eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pCW510-parC	pCW510-parC eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pCW512-parA	pCW512-parA eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pCW512-parB	pCW512-parB eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pCW512-parC	pCW512-parC eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pMT335	pMT335 eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pMT335-parS1	pMT335-parS1 eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pMT335-parS2	pMT335-parS2 eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pMT335-parSCc	pMT335-parSCc eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pMT335-ParBΔ52C	pMT335-parBΔ52C eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pMT335-ParBΔ41N	pMT335-parBΔ41N eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac pMT335-ParBΔ89N	pMT335-parBΔ89N eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac ParB _{R102A_N134A}	pMT335-parB _{R102A_N134A} eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac	pMT335-parB _{R170A_S171A} eletroporado em Xac WT,	Este trabalho

ParB _{R170A_S171A} Xac	Ap ^R , Gm ^R pMT335-parB _{R102A_N134A} eletroporado em Xac WT,	Este trabalho
ParB _{R102A_N134A} Xac ParA _{K20Q}	Ap ^R , Gm ^R pCW510-parA _{K20Q} eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
Xac ParA _{G12V}	pCW510-parA _{G12V} eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R	Este trabalho
ParA _{D40A} Xac ΔparBchr	pCW510-parA _{D40A} eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Gm ^R pMT335-parB eletroporado em Xac contendo <i>parB</i>	Este trabalho Este trabalho
pMT335-parB Xac	pBBR1MCS5-parAB eletroporado em Xac	Este trabalho
<i>parB</i> ::pAPU2 pBBR1MCS5- parAB Xac	<i>parB</i> ::pAPU2, Ap ^R , Km ^R , Gm ^R pCW510-parB eletroporado em Xac <i>parB</i> ::pAPU2,	Este trabalho
<i>parB</i> ::pAPU2 pCW510-parB Xac	Ap ^R , Km ^R , Gm ^R pCW510-zapA eletroporado em Xac <i>parB</i> ::pAPU3	Este trabalho
<i>parB</i> ::pAPU3 pCW510-zapA Xac	pCW510-parA eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Km ^R ,	Este trabalho
<i>parB</i> ::pAPU2 pCW510-ParA Xac	Gm ^R pCW512-parA eletroporado em Xac WT, Ap ^R , Km ^R ,	Este trabalho
<i>parB</i> ::pAPU2 pCW512-parA <i>C. crescentus</i>	Gm ^R pMT335 eletroporado em <i>C. crescentus</i> , Gm ^R	Este trabalho
pMT335 <i>C. crescentus</i>	pMT335-parBΔ52C eletroporado em <i>C. crescentus</i> ,	Este trabalho
pMT335- parBΔ52C <i>C. crescentus</i>	Gm ^R pMT335-parBΔ41N eletroporado em <i>C. crescentus</i> ,	Este trabalho
pMT335- parBΔ41N <i>C. crescentus</i>	Gm ^R pMT335-parBΔ89N eletroporado em <i>C. crescentus</i> ,	Este trabalho
pMT335- parBΔ89N <i>C. crescentus</i>	Gm ^R pMT335-parS1 eletroporado em <i>C. crescentus</i> , Gm ^R	Este trabalho
pMT335-parS1 <i>C. crescentus</i>	pMT335-parS2 eletroporado em <i>C. crescentus</i> , Gm ^R	Este trabalho
pMT335-parS2 <i>C. crescentus</i>	pMT335-parB _{R170A_S171A} eletroporado em <i>C. crescentus</i> ,	Este trabalho
parB _{R170A_S171A} <i>C. crescentus</i>	Gm ^R pMT335-parB _{R102A_N134A} eletroporado em <i>C. crescentus</i> ,	Este trabalho
parB _{R170A_S171A}	Gm ^R	

* Ap^R, Km^R, Gm^R, e Chl^R indicam resistência a ampicilina, canamicina, gentamicina e cloranfenicol respectivamente

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeos	Características Relevantes	Referência
pBS1479	Vetor de expressão com TAP-tag, GAL1	Puig et al., 2001
pPM2a e pPM7g	Vetores de expressão com GFP; <i>xylR pxyl gfpmut1 bla neo</i>	Martins et al., 2010
pCR2.1-TOPO	Vetor para clonagem; <i>lacZα neo</i>	Invitrogen
pSG4650	Derivado de pET21-d com <i>spo0J</i>	Henrique Ferreira
pOK12	Derivado de pUC	Patrick Viollier lab.
pHF5Ca	Vetor de expressão com TAP-tag; <i>xylR pxyl tap1479 bla neo</i>	Ucci et al., 2014
pAPU1	pHF5Ca-parB: <i>xylR pxyl parB-tap1479 bla neo</i>	Ucci et al., 2014
pAPU2	Derivado de pCR-2.1-TOPO com <i>parB124-769; bla neo</i>	Ucci et al., 2014
pAPU3	pPM7g-parB: <i>xylR pxyl parB-gfpmut1 bla neo</i>	Ucci et al., 2014
pAPU4	pET21-a com <i>parB</i>	Este trabalho
pBBR1MCS-5	Vetor para complementação; <i>lacZα</i>	Kovach et al. 1995
pBBR1MCS-5-parAB	Vetor para complementação com <i>pparAB, parAB lacZα</i>	Este trabalho
pNPTS138	Vetor integrativo, <i>sacB</i>	Dickon Alley
pNPTS138ΔparB	Deleção de <i>parB, sacB</i>	Este trabalho
pMT335	Vetor de expressão; <i>vanR, pvan</i>	Thanbichler, et al., 2007
pMT335-parA	Expressão <i>parA, vanR, pvan</i>	Este trabalho
pMT335-parB	Expressão <i>parB, vanR, pvan</i>	Este trabalho
pMT335-ParBΔ52C	Expresão <i>parBΔ52C, vanR, pvan</i>	Este trabalho
pMT335-ParBΔ41N	Expresão <i>parBΔ41N, vanR, pvan</i>	Este trabalho
pMT335-ParBΔ89N	Expresão <i>parBΔ89N, vanR, pvan</i>	Este trabalho
pMT335-ParB _{R102A_N134A}	Expresão <i>parB_{R102A_N134A}, vanR, pvan</i>	Este trabalho
pMT335-ParB _{R170A_S171A}	Expressão de <i>ParB_{R170A_S171A}, vanR, pvan</i>	Este trabalho
pMT335-parS1	Cópias extras de <i>parS1</i>	Este trabalho
pMT335-parS2	Cópias extras de <i>parS2</i>	Este trabalho
pMT335-parSCc	Cópias extras de <i>parSCc</i>	Este trabalho
pMT335-mCherry	Vetor de expressão com mCherry, <i>vanR, pvan</i>	Silvia Ardissonne

pMT335-mCherry-zapA	Expressão de <i>zapA-mCherry</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW512	Vetor de expressão com TAP-tag, <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Thanbichler, et al., 2007
pCW512-parA	Expressão de <i>parA-tap</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW512-parB	Expressão de <i>parB-tap</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW512-parC	Expressão de <i>parC-tap</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW510	Vetores de expressão com GFP, <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Thanbichler, et al., 2007
pCW510-parA	Expressão de <i>parA-gfp</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW510-parB	Expressão de <i>parB-gfp</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW510-parC	Expressão de <i>parC-gfp</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW510-ParA _{K20Q}	Expressão de <i>parA_{K20Q}-gfp</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW510-ParA _{G12V}	Expressão de <i>parA_{G12V}-gfp</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho
pCW510-ParA _{D40A}	Expressão de <i>parA_{D40A}-gfp</i> , <i>vanR</i> , <i>pvan</i>	Este trabalho

**bla*, *neo* e *sac* genes para b-lactamase, neomicina fosfotransferase e levansucrase, respectivamente.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
PBS1479F	TGAGGATCCATGGAAAAGAGAAGATGGAAAAAG
PBS1479R	<u>ATTCTAGATCAAGCTTCAGGTTGACTTCCCCGCGG</u>
parBintF	GATAGCTTGCGCCAGTTGC
parBintR	CCTGTGGGGCCACCGGCGC
ParBF20070822	ATGGATCCATGAACAAGCCGATCCCCGCAAAGAAG
ParBR20080530	<u>ATGGATCCGCTACGCTGCATGCGCAGGC</u>
ParB20100309	<u>ATCTCGAGACCCAAGCTACGCTGCATGCGCAGGC</u>
parB-pET28aF	<u>ATCCATGGGCAACAAGCCGATCCCCGCAAAGAAG</u>
parB-pET28aR	<u>ATCTCGAGAACCCAAGCTACGCTGCATGCGCAG</u>
FparAB	<u>ATCTCGAG</u> CGTCGACAACAACATCCATA
RparAB	ATAAGCTT <u>CCTGTTGGATGTGCAAGCG</u>
delta_parB F1	AATGTCGACTGCAGCGCTACCGGGCCAT
delta_parB R1	AATGAATTCGGGGATCGGCTTGTTTCAT
delta_parB F2	ATGAATTCGAACGCCTGCGCATGCAG
delta_parB R2	AATGGGCCCGGTTGGTCCACGCGCTGG
parB_OUT1	CAATGTGACCAGCCTGCGCGAA
parB_OUT2	CGCCAGCACCGCACGGCTGAA
Xac_parB_nde	AAAACATATGAACAAGCCGATCCCCGCAA
Xac_parB_eco+stop	AAAAGAATTCTTAGCTGCGCTGCATGCGCAGGGCGT
Xac_parB_eco-stop	AAAAGAATTCGCTGCGCTGCATGCGCAGGGCGT
XAC3905_nde	AAAAAACATATGCGTATCTGGGCAATCGCCAA
XAC3905_eco-stop	AAAAAAGAATTCGACGGTCTCCACGGGCCGGA
XAC1907_nde	AAAAAACATATGCGTATCTGGGCAATCGCCA
XAC1907_eco-stop	AAAAAAGAATTCTGCGGCTTGCTCCATACGCA
parB_52C_Eco	AAAGAATTCACTGTGGGGCCACCGGCGCC
parB_41N_Nde	AAAACATATGGATAGCTTGCGCCAGTTGC G
parB_N89_Nde	AAACATATGGCACCGGCGCAGTTCGAGAT
zapA-Nde	AAAACATATGAGCAACAACGAACCGGTCA
zapA-EcoRI	AAAAGAATTCGCGCGGTGTGTGCGGCAACGCT
parA_K16Q	GAAGGGCGGCGTTCGGCCAGACCACGACCGCCG
parA_K16Q_as	CGGCGGTTCGTGGTCTGGCCGACGCCGCCCTTC
parA_G12V	TTGCCAACAGAAAGGTCGGCGTCGGCAAGAC
parA_G12_as	GTCTTGCCGACGCCGACCTTCTGGTTGGCAA
parA_D40A	TTGCTGGTGGATCTGGCCTCGCAGGGCAACGC
parA_D40A_as	GCGTTGCCCTGCGAGGCCAGATCCACCAGCAA

* Sítios de restrição utilizados nas clonagens estão sublinhados

digestão enzimática com *Bam*HI, quantificados e ligados por 16h a 16°C. O vetor pAPU2, utilizado na disrupção de *parB* de *Xac*, foi gerado através da ligação do cassete *parB*₁₂₄₋₇₆₉ (o qual foi amplificado a partir do DNA cromossomal de *Xac* e par de oligonucleotídeos *parB*_{intF/R}), e ligação no vetor PCR-2.1-TOPO (Invitrogen). Em seguida, o vetor pAPU3 foi construído para a expressão de ParB-GFP. Este é um vetor derivado do vetor pPM7g (Martins et al., 2010) contendo o gene *parB* amplificado através de DNA cromossomal de *Xac* e par de oligonucleotídeos ParBF20070822 e ParB20100309, digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I e ligado nos mesmos sítios do vetor (que também foi submetido às mesmas reações de digestões). O vetor pAPU4, utilizado na expressão de ParB-His6, foi construído através da amplificação por PCR de *parB*, utilizando como molde DNA cromossomal de *Xac* e os oligonucleotídeos ParB-pET28aF/R. Inseto e vetor (pET28a - Novagen) foram digeridos com as enzimas *Nco*I e *Xho*I e ligados por 16h a 16°C.

O vetor replicativo de baixo número de cópias pBBR1MCS-5 (Kovach et al. 1995) foi utilizado para testes de complementação. A região correspondente aos genes *parA*, *parB* e região promotora foi amplificada utilizando o par de oligonucleotídeos FparAB e RparAB. Inseto e vetor foram digeridos com as enzimas *Xho*I e *Hind*III, purificados e ligados por 16h a 16°C.

Os vetores pMT335-*parA* e pMT335-*parB* foram utilizados para a expressão das proteínas ParA e ParB. pMT335 é um vetor de expressão replicativo que contém promotor regulado por vanilato (Thanbichler et al., 2007). Neste experimento, os genes *parA* e *parB* foram amplificados da região cromossomal de *Xac* utilizando os pares de oligonucleotídeos XAC3905-nde e XAC3905-eco-stop ou XAC_*parB*-nde e XAC_*parB*-eco-stop, respectivamente. Inseto(s) e o vetor foram digeridos com as enzimas *Nde*I e *Eco*RI, purificados e ligados por 16h a 16°C.

A expressão da fusão *zapA*-mCherry foi realizada a partir da amplificação do gene *zapA* de *Xac* utilizando DNA cromossomal como molde e o par de oligonucleotídeo *zapA*-Nde e *zapA*-EcoRI. Para isso foi utilizado o vetor replicativo pMT335-mCherry; que é derivado do vetor pMT335 e contém o gene que codifica para a expressão de fusão com mCherry na região C-terminal da proteína de interesse (Ardissone, S.). Inseto e vetor foram digeridos com as enzimas *Nde*I e *Eco*RI, purificados e ligados por 16h a 16°C.

Os vetores de expressão pCW510 e pCW512 foram utilizados para expressão das versões proteicas: ParA-TAP, ParB-TAP, ParC-TAP, ParA-GFP, ParB-GFP e ParC-GFP. Ambos os vetores são replicativos e derivados do vetor pMT335, contendo a adição de *tap* (pCW510) ou *gfp* (pCW512) para fusões na região C-terminal da proteína de interesse. Neste ensaio, os genes *parA*, *parB* e *parC* de *Xac* foram amplificados por PCR utilizando como molde DNA cromossomal da bactéria e os pares de oligonucleotídeos XAC3905-nde e XAC3905-eco-stop, XAC_parB-nde e XAC_parB-eco ou XAC1907-nde e XAC1907-eco-stop respectivamente. Inseto(s) e vetor(es) foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e ligados por 16h a 16°C.

A expressão das formas truncadas da proteína ParB; ParB52C, ParB41N e ParB89C foram realizadas a partir da amplificação de parte do gene *parB* utilizando como molde o vetor pMT335-parB e os pares de oligonucleotídeos XAC_parB-nde e parB_52C_Eco, parB_41N_Nde e Xac_parB-eco-stop e parB_N89_Nde e Xac_parB-eco-stop, respectivamente. Os três fragmentos e o vetor pMT335 foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*, purificados e ligados por 16h a 16°C.

Para a obtenção de cópias extras de *parS* em *Xac* foram construídos os vetores pMT335-parS1 e pMT335-parS2. Os dois fragmentos utilizados neste ensaio, *parS1* e *parS2*, foram desenhados usando como referência os dois principais picos encontrados na figura gerada após experimentos de CHIP-seq de ParB e sintetizados pela empresa Fasteris (www.fasteris.com) (resultados e discussão). Ambos os fragmentos e o vetor pMT335 foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*, purificados e ligados por 16h a 16°C.

Após as clonagens realizadas, todos os fragmentos foram confirmados por sequenciamento para a continuação dos experimentos.

Mutações sítio-dirigida

A obtenção das duas mutações pontuais na proteína ParB de *Xac*, ParB_{R102A_N134A} e ParB_{R170A_S171A}, foram adquiridas através da síntese dos fragmentos mutagenizados fornecidos pela empresa Fasteris. As duas versões sintéticas do gene *parB* de *Xac* contendo as mutações sítio-específicas foram transferidas para o vetor

pMT335 através de digestão enzimática utilizando as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. Fragmentos e vetor foram purificados e ligados por 16h a 16°C.

Para as mutações pontuais em *parA* de *Xac*, este foi amplificado utilizando como molde pMT335-*parA* e o par de oligonucleotídeos XAC3905-*nde* e XAC3905-*eco*. Inseto e o vetor de clonagem pOK12 foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*, purificados e ligados por 16h a 16°C, gerando a construção pOK12-*parA*. Posteriormente, esta construção foi amplificada por PCR utilizando a enzima PfuUltra DNA polimerase (Stratagene), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante, e os seguintes pares de oligonucleotídeos: *parA_G12V* e *parA_G12V_as* para a obtenção da mutação *ParA_{G12V}*; *parA_D40A* e *parA_D40A_as* para a obtenção da mutação *ParA_{D40A}* e *parA_K16Q* e *parA_K16Q_as* para a obtenção da mutação *ParA_{K16Q}*. Os produtos de PCR foram purificados, digeridos com a enzima *DpnI* por 2 horas a 37°C, purificados novamente e eletroporados em linhagem de *E. coli* EC100. Os três fragmentos de *parA* contendo as mutações pontuais foram confirmados por sequenciamento e transferidos para o vetor pCW510 utilizando as mesmas enzimas de restrição citadas acima.

Deleção de *parB*

O nocaute gênico de *parB* de *Xac* foi realizado utilizando dois fragmentos de aproximadamente 1200 pb e 1000 pb localizados na região cromossomal que flanqueia este gene na bactéria. O fragmento de aproximadamente 1200 pb foi amplificado utilizando como molde DNA cromossomal de *Xac* e os oligonucleotídeos *delta_parB F1/delta_parBR1* e digerido com enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*. O segundo fragmento, quem contém aproximadamente 1000 pb foi amplificado utilizando como molde DNA cromossomal de *Xac* e os oligonucleotídeos *delta_parB F2/delta_parBR2* e digerido com as enzimas *ApaI* e *EcoRI*. O vetor suicida pNPTS (Dickon Alley, dados não publicados) foi digerido utilizando as enzimas *SalI* e *ApaI* e deste modo, fragmentos e vetor foram purificados e submetidos a reação de ligação, criando-se assim, a deleção do gene *parB* no plasmídeo (pNPTS- Δ *parB*). pNPTS- Δ *parB* foi eletroporado na linhagem selvagem de *Xac* e as bactérias transformantes foram selecionadas em meio LB contendo canamicina. Posteriormente, algumas

colônias foram crescidas durante a noite em meio LB líquido para a obtenção do segundo evento de recombinação. No dia seguinte, alíquotas da cultura foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB suplementado com 3% de sacarose e, as colônias que cresceram neste meio foram repicadas em novo meio LB contendo ou não canamicina. Os clones considerados positivos (sensíveis a canamicina e resistentes a sacarose) tiveram sua deleção confirmada por reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos parB_OUT1 e parB_OUT2.

DNA, RNA e proteínas

Técnicas de biologia molecular envolvendo DNA, RNA e/ou proteínas seguiram Sambrook, et al. (1989) e protocolos de kits de extração e manipulação de ácidos nucleicos foram adquiridos de empresas como Qiagen, Fermentas e Invitrogen. Eletrotransformação de *Xac* seguiu Ferreira et al. (1995). Eletrotransformação de *C. crescentus* seguiu Viollier et al. (2004). PCRs para amplificação de ORFs e cassetes para clonagem foram realizadas da seguinte maneira: 5ng de DNA, tampão da enzima *Pfu* DNA polimerase para 1X final (Fermentas), já contendo 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 1U de *Pfu*, 1 µM de cada primer e água para 20 µl finais. Para a amplificação do gene *parB* foi necessária a inclusão de formamida para 5% finais na reação de PCR. A PCR “*touch down*” foi realizada da seguinte maneira: desnaturação inicial a 94°C/3min, seguido de 15 ciclos de 94°C/30'', A°C /30'' e 70°C/2 min por cada 1000 pb de DNA a ser amplificado (A= 65°C até 51°C; a temperatura de anelamento inicial foi de 65°C com diminuição de um grau a cada ciclo num total de 15 ciclos). Finalmente, realizamos mais 20 ciclos de 94°C/30'', 50°C /30'' e 70°C/2 min por cada 1000 pb de DNA a ser amplificado para multiplicação das moléculas inicialmente isoladas no *touch down*. Tal estratégia foi utilizada no isolamento de genes para clonagem em vetores de expressão, para construção dos vetores de expressão, bem como para gerar fragmentos de DNA destinados a disrupções gênicas e produção de sondas de DNA.

Expressão de proteínas

Em sistema de expressão de proteínas contendo TAGs (GFP, mCherry, His-6 ou TAP) em Xac, estando os sistemas de expressão integrados no genoma ou em vetor replicativo, as células foram ativadas mediante inoculo de colônias isoladas em placa em meio LB contendo antibiótico quando necessário (3 mL para Western Blotting e 50 mL para purificação de proteínas) e cultivadas por 14-16h a 30°C e 180 rpm. No dia seguinte, culturas bacterianas foram diluídas 1:10 em frascos Erlenmeyer contendo o mesmo meio (50 mL para Western Blotting e 500 mL para purificações de proteínas) e crescidas a 30°C com agitação de 180 rpm até D.O._{600nm} = 0,3-0,4. Neste ponto, os indutores foram adicionados para a concentração final desejada e as culturas foram incubadas por mais 4h a 30°C e 180 rpm para expressão de proteínas. Ao final da indução, células foram resgatadas através de centrifugação a 5000 xg por 15min, lavadas uma vez em solução tamponada (Tris-HCl 30 mM pH8,0 e NaCl 150 mM) e a massa celular foi congelada a -80°C para processamento posterior.

SDS-PAGE e Western blotting

Extrato de proteínas totais foi preparado dissolvendo-se 20 µg de massa celular em 180 µL de tampão de amostra contendo SDS. As amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos e centrifugadas para remoção de restos celulares (Sambrook, et al., 1989). SDS-PAGE, coloração com coomassie e transferência de proteínas para membrana de PVDF seguiram (Sambrook et al., 1989). Para detecção de GFP na membrana de PVDF (GE) foi utilizado o anticorpo primário policlonal anti-GFP gentilmente cedido por Dr. Frederico Gueiros-Filhos (Depto. de Bioquímica, IQ, USP, SP). Foi utilizado como anticorpo secundário o anti-IgG de coelho (acoplado a HRP) do kit “Amersham ECL Western Blotting System” (GE). A reação de quimioluminescência foi realizada segundo recomendações contidas no kit. O filme utilizado para revelação do Western Blotting foi o Hyperfilm (GE). Para a detecção de ProteínaA dos TAP-TAGs, foi utilizado diretamente anticorpo secundário acoplado a HRP anti-IgG de cavalo produzido em coelho. ProtA possui alta afinidade por IgG de coelho e se liga a esta mesmo após tratamento ácido (eluição de IgG-sepharose) ou com SDS e estando imobilizada em PVDF (Weser, et al., 2006). A reação de quimioluminescência e revelação seguiram padrão do kit ECL.

Purificação de ParB-His6

A fusão ParB-His6 foi induzida na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS a qual foi transformada com o plasmídeo pAPU4 (pET28a-parB). Para purificação proteica, linhagens bacterianas foram cultivadas em 1 L de meio LB até D.O._{600nm} = 0,5 quando IPTG foi adicionado para 1 mM final. Neste momento a cultura foi induzida a 30°C por 3h. Em seguida, a massa celular foi coletada por centrifugação e mantidas durante a noite a -80°C. No dia seguinte as células foram dissolvidas em 10 mL do tampão A (300 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, 10% glicerol), contendo um tablete de inibidores de proteína livre de EDTA (Roche) e submetidas à sonicação. O lisado foi centrifugado a 50.000 xg por 1h e subsequentemente carregado em resina de Ni²⁺-chelating HiTrap de 1 mL com o auxílio do ÄKTA-FPLC (GE). ParB-His6 foi lavado/eluído da resina de Ni²⁺ usando um gradiente em step com aumento da concentração de imidazol. O eluato da resina de Ni²⁺ (200 mM imidazol) foi agrupado e carregado novamente em coluna de Heparina HiTrap de 1 mL (GE). ParB-His6 foi lavado com tampão A e eluído em um gradiente de sal linear utilizando tampão B (1,5 M NaCl, 30 mM Tris-HCl, 10% glicerol). As proteínas foram liberadas da coluna contendo Heparina com uma força iônica de ~ 600 mM. Em seguida, as frações eluídas da coluna de heparina foram dializadas em tampão A e as concentrações proteicas foram determinadas utilizando medidas em UV. Antes de serem estocadas a -80°C as concentrações proteicas foram ajustadas para 1 mg/mL. Em ensaios de gel-filtração, ~ 200 mg/mL de ParB-His6 foi dializada em tampão C (150 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, 10% glicerol) antes de ser carregada em resina Superdex200 HR 10/30 (GE). As lavagens foram realizadas utilizando o mesmo tampão.

Gel shift

A fusão ParB-His6 foi diluída em tampão A (supracitado) e as reações de ligação foram realizadas em tampão C em um volume final de 10 mL por 10 minutos a 25°C. O DNA usado como substrato foi preparado através de triplas reações de restrição do vetor pSG4650 (Ferreira, H.) em apenas uma reação enzimática: *NcoI/XhoI/NdeI* (DNA contendo 473 pb e a região *parS*, e DNA contendo 379 pb sem

a região *parS*). Após reação de ligação, os complexos proteína-DNA foram separados em gel de agarose 1% em TBE-1X a temperatura ambiente. Os complexos foram corados com brometo de etídeo e detectados através de fluorescência com o auxílio do scanner Typhoon fluorimager (GE). As análises quantitativas foram feitas utilizando o software AIDA (Raytest).

Microscopia de fluorescência

As células foram cultivadas em meio LB até atingirem a $D.O_{600nm} \sim 0,3$. Neste momento as células foram imobilizadas para visualização em lâminas contendo agarose 1% em PBS-1X. O microscópio utilizado neste experimento foi Olympus BX-61 equipado com câmera automática XM10 com câmera operada pelo software Cell^F ou o microscópio Zeiss Axio Imager.M2, Zeiss alpha Plan-Apochromatic 100x/1.46 [DIC (UV) VIS-IR] e Zeiss A-Plan 10x/0.25 Ph1 e Photometrics evolue com camera operada pelo software Metamorph 7.2. As imagens mostradas nas figuras foram preparadas utilizando os softwares ImageJ versão 1.42j e Adobe Photoshop CS4 versão 11.0.

Cuva de crescimento

Duas ou três colônias das linhagens *Xac* WT e *Xac parB::pAPU2* foram inoculadas em meio LB líquido durante a noite a 30°C e 200 rpm. No dia seguinte, a suspensão bacteriana foi utilizada para inoculo em novo meio LB ajustando-se a $D.O_{600nm} = 0,1$. As novas culturas foram crescidas por 30h a 30°C e 200 rpm. Durante este período, a $D.O_{600nm}$ foi medida a cada 6h com erros de até 30 minutos. O experimento foi realizado em triplicata.

Testes de patogenicidade

A planta hospedeira utilizada neste estudo foi limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). As plantas foram cultivadas em estufas com variação de temperatura entre 25°C e 40°C. Células foram cultivadas em meio LB até atingirem a D.O._{600nm} ~ 0,4 quando foram diluídas 1.000X no mesmo meio. A suspensão celular foi inoculada na superfície abaxial das folhas com a ajuda de seringas hipodérmicas de 1 mL. Os sintomas de cancro cítrico foram avaliados durante um período de 30 dias ou até a queda da folha inoculada.

Imunoprecipitação da cromatina (ChIP) seguida de sequenciamento em larga escala (ChIP-Seq)

As linhagens Xac pCW512-parA e Xac pCW512-parB foram crescidas até alcançarem a fase midi-log e então submetidas a crosslink em solução 10 mM fosfato de sódio (pH 7,6) e 1% formaldeído a temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em tampão PBS 1X e lisadas em solução Ready-Lyse lysozyme solution (Epicentre, Madison, WI) de acordo com recomendações fornecidas pelo fabricante. O lisado celular foi submetido a sonicação (Sonifier Cell Disruptor B-30) (Branson Sonic Power. Co., www.bransonic.com/) com 10 ciclos de 20 segundos em gelo (para a obtenção de fragmentos de DNA contendo entre 300-500 pb) e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos a 4°C. Os lisados foram normalizados utilizando “protein content” diluídos em 1 mL do tampão ChIP (0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl [pH 8,1], 167 mM NaCl e inibidores de protease (Roche, www.roche.com/), pré-limpos com 80 µL de Proteína-A agarose (Roche, www.roche.com/) e 100 µL de BSA. O sobrenadante foi incubado por pelo menos 1h a 4°C na presença de 100 µL de *beads* de proteína-A agarose pré saturadas com BSA. Foi adicionado 100 µL de *beads* de IgG sefarose ao sobrenadante e a mistura incubada durante a noite a 4°C. O pellet foi lavado uma vez com tampão contendo baixa concentração de sal (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 150 mM NaCl), uma vez com tampão contendo alta concentração de sal (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 500 mM NaCl), uma vez com tampão LiCl (0,25M LiCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sódio,

1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,1) e duas vezes com tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.1) e 1 mM EDTA). Os complexos DNA-proteína foram eluídos em 500 µL de solução fresca de tampão de eluição (1% SDS, 0,1 M NaHCO₃) suplementado com NaCl para concentração final de 300 mM e, posteriormente incubados durante a noite a 65°C para reverter o crosslink. As amostras foram tratadas com 2 µg de Proteinase K por 2h a 45°C em 40 mM EDTA e 40 mM Tris-HCl (pH 6,5). O DNA foi extraído usando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com etanol e usando 20 µg de glicogênio como carreador. O DNA foi lavado duas vezes em etanol 75% e ressuspendido em 100 µL de água para análises futuras.

Inserções de transposon no genoma (Tn) seguida de sequenciamento em larga escala (Tn-Seq)

Neste experimento, a transferência de plasmídeos em *Xac* foi realizada utilizando o método de conjugação bacteriana com a linhagem doadora de *E. coli* S17 (que porta o vetor contendo o transposon mariner Tn Mar2XT7 que confere resistência à gentamicina) e as linhagens receptoras *Xac parB::pAPU1* e *Xac parB::pAPU2*. As linhagens foram crescidas em meio LB durante a noite a 30°C e, no dia seguinte, diluídas e crescidas por mais 3h. Aproximadamente 1 mL de pellet de cada linhagem receptora e 500 µL da linhagem doadora foram lavados duas vezes, ressuspendidos em 50 µL de meio de cultura e, a linhagem doadora foi misturada com cada linhagem receptora para o processo de conjugação (realizado durante 6h a 30°C). Os transformantes foram selecionados em placas de Petri contendo meio LB suplementados com gentamicina e canamicina. Pós conjugação, as colônias foram removidas das placas e agrupadas em um volume final de 10 mL. As células foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes para a extração de DNA e obtenção da biblioteca. Para a preparação das bibliotecas, as culturas foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão P1 buffer (kit Quiagen) com 250 U/mL de ReadyLyse. A seguir, foi adicionado 1 mL de DNazol (Invitrogen) e dois volumes de etanol 100% para a precipitação do DNA. O precipitado foi dissolvido em 1 mL de 8 mM NaOH, centrifugado e o sobrenadante transferido para novo microtubo. O DNA foi neutralizado com 30 µL de 1 M HEPES (pH 7) para futuras análises.

Motilidade

Os ensaios de motilidade foram realizados conforme descrito por Rashid & Kornber (2000). As linhagens de *Xac* WT e *Xac parB::pAPU2* foram crescidas durante a noite em meio PYM e, no dia seguinte, 3 μ L das culturas bacterianas foram inoculadas em placas de Petri contendo 0,25% de agar em meio NYGB, para ensaios de swimming, e 0,5% de agar em meio PYM para ensaios de sliding. A motilidade foi avaliada qualitativamente após 72h examinando o halo formado pelo crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ParB é expressa em Xac

A anotação da sequência do genoma de Xac mostrou a presença de pelo menos 5 ORFs tipo *parA* no principal cromossomo da bactéria com as seguintes designações: XAC0192, XAC1907, XAC2205, XAC2433 e XAC3905. A última delas, XAC3905 foi encontrada como parte de um pequeno operon (*parAB*) junto com a ORF XAC3906, a qual foi identificada como homólogo de *parB* (da Silva et al., 2002). A fim de verificar se *parB* é expresso em Xac, a atividade do promotor de *parAB* (*pparAB*) foi monitorada. A linhagem Xac *parB::pAPU1* possui a habilidade de expressar a cauda TAP (ParB-TAP), a qual foi inserida no genoma sob o controle do promotor *pparAB* e em fusão com ParB. Essa linhagem foi preparada através da integração do plasmídeo suicida pAPU1 (o qual contém a fusão *parB-tap1479*) (Xac *parB::pPAU1*) através de um único evento de recombinação no locus *parB* de Xac. Seguida a integração de pAPU1, o gene *parB* foi duplicado de modo que a cópia nativa do gene ficou adjacente ao promotor de xilose que estava no plasmídeo (*p_{xyl}*) enquanto a fusão *parB-tap1479* teve sua expressão governada pelo promotor nativo do operon *parAB* (Figura 4B). A estrutura genômica de dois mutantes Xac *parB::pPAU1* selecionados foram avaliadas através de técnicas de Southern blotting. Nestes ensaios, o gene *parB* foi utilizado como sonda (Figura 4C) e as bandas de detecção de hibridização de 1031 pb e 5615 pb confirmaram a integração de pAPU1 no locus *parB* (comparar canaletas 1-3 e 2-3). Para detectar a produção de ParB-TAP de Xac *parB::pAPU1*, as células foram cultivadas em meio LB até atingirem a fase midi-log e foram subsequentemente submetidas a detecção imunológica através de TAP em ensaios de Western blotting (Figura 4D). Como resultado, um sinal de aproximadamente 54 kDa foi observado nos dois mutantes analisados, o que é consistente com o tamanho esperado para ParB-TAP (canaletas 5-6). Também foi incluído nessas análises dois mutantes em que pAPU1 foi integrado no locus *amy* através da recombinação entre o fragmento *amy106-912* contido no vetor pAPU1 e o gene alfa-amilase de Xac (Xac *amy::pAPU1*). Deste modo, a expressão ectópica de ParB-TAP serve como controle. A linhagem Xac *amy::pAPU1* também expressa ParB-TAP, porém em níveis maiores (compare as canaletas 1 e 3 e 2 e 4 em culturas não induzidas e induzidas com xilose, respectivamente, com canaletas 5-6) devido ao

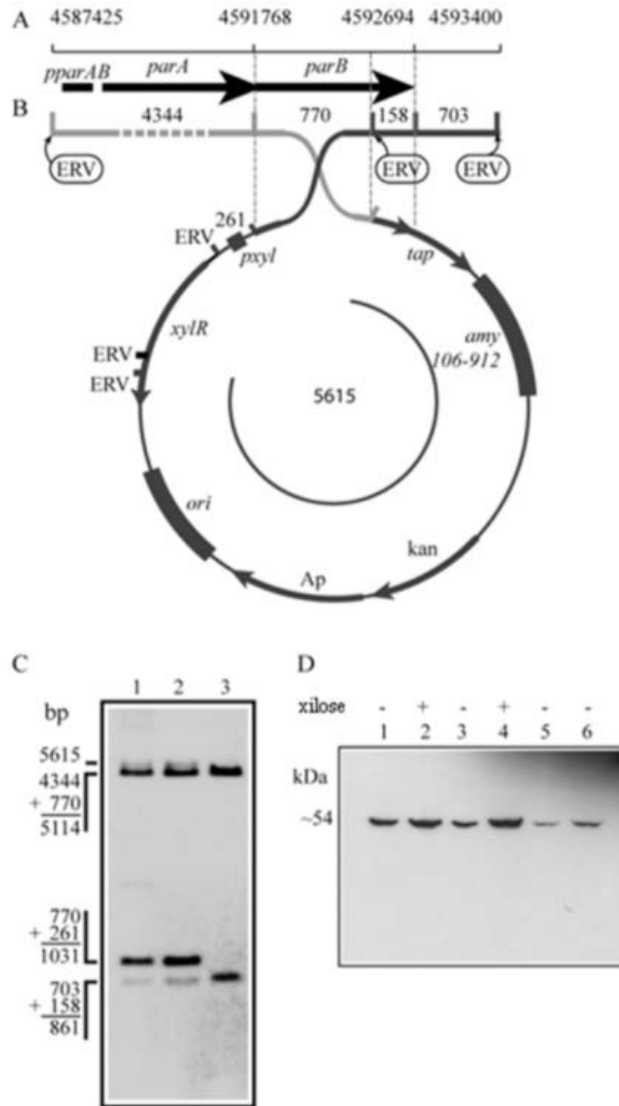


Figura 4. Atividade do operon *parAB* de *Xac*. A atividade do operon *parAB* foi demonstrada através da habilidade da linhagem *Xac parB::pAPU1* em expressar ParB-TAP sob controle do promotor nativo de *parAB*. **A)** Coordenadas genômicas do operon *parAB*. **B)** Esquema de integração de pAPU1 (contendo a fusão *parB-tap*) no locus *parB*. Os números acima do mapa e em volta do círculo indicam os tamanhos em pares de bases dos fragmentos delimitados de DNA; ERV, sítios de restrição *EcoRV*. **C)** Análises de Southern blotting as linhagens *parB::pAPU1* de *Xac*: DNA genômico foi digerido com *EcoRV* e subsequentemente hibridizados com *parB* marcado com DIG. Os tamanhos dos fragmentos de DNA detectados correspondem aos ilustrados em **B**. Canaletas 1 e 2, linhagens *Xac parB::pAPU1* 1 e 2, respectivamente; 3) *Xac* selvagem. **D)** Western blotting foi realizado para detectar ParB-TAP em extratos proteicos das linhagens *Xac parB::pAPU1* e *Xac amy::pAPU1*. Canaletas 1-2, *Xac amy::pAPU1* linhagem 1; 3-4, *Xac amy::pAPU1* linhagem 2; 5, *Xac parB::pAPU1* linhagem 1; 6, *Xac parB::pAPU1* linhagem 2. O indutor (xilose) foi adicionado como descrito anteriormente.

vazamento do promotor de xilose em *Xac*. A baixa expressão de ParB-TAP dos mutantes *Xac parB::pAPU1* deve-se, provavelmente, ao fato destas células possuírem *parB-tap* sob controle do promotor nativo de *parAB*. Em suma, a expressão de ParB-TAP através do promotor nativo *pparAB* mostra uma atividade estável em níveis naturais/fisiológicos do operon *parAB* de *Xac*, sugerindo o primeiro indício de que *Xac* pode utilizar o sistema de partição cromossômica tipo ParAB/*parS* descrito em diversas bactérias (Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012).

Localização subcelular de ParB-GFP

O padrão de localização de várias proteínas tipo ParB codificadas pelo cromossomo vem sendo documentadas *in vivo*, o que constitui um excelente indicativo da sua função na segregação cromossômica (Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2011). Para estender ainda mais a caracterização de ParB, foram geradas duas linhagens de *Xac* que são capazes de expressar ParB fusionada com GFP. A primeira linhagem, *Xac parB::pAPU3*, expressa ParB-GFP sob o controle de *pparAB*, enquanto que a segunda linhagem, *Xac amy::pAPU3*, expressa a fusão ectópica (do locus *amy*) utilizando o promotor de xilose de pAPU3 (estas linhagens foram construídas usando a mesma estratégia retratada acima, para a expressão de ParB-TAP). Os resultados mostrados a seguir foram aqueles obtidos somente com a linhagem *Xac parB::pAPU3*, pois são estas as linhagens que expressam ParB-GFP através do promotor nativo de *parAB* em níveis fisiológicos (Figura 5). No painel A da Figura 5 (I-II), está mostrado o padrão de ParB-GFP em células que não possuem um sinal claro de constrição do septo. Nota-se, nestas figuras, a presença de dois foci por compartimento celular, cada um ocupando o pólo celular ou equivalente as regiões $\frac{1}{4}$ e $\frac{3}{4}$ das células. A localização subcelular de ParB-GFP mostra-se muito semelhante as localizações já reportadas para Spo0J-GFP em *B. subtilis* (Glaser et al., 1997). A observação das células em vários campos diferentes também evidenciou outro tipo de localização, onde o focus de ParB-GFP está dividido em dois foci em apenas um dos pólos do compartimento celular (Figura 5A-III, flecha), enquanto em outro compartimento celular permanece único. O padrão visto na Figura 5A-III foi documentado com mais frequência, sendo provavelmente resultante da iniciação de

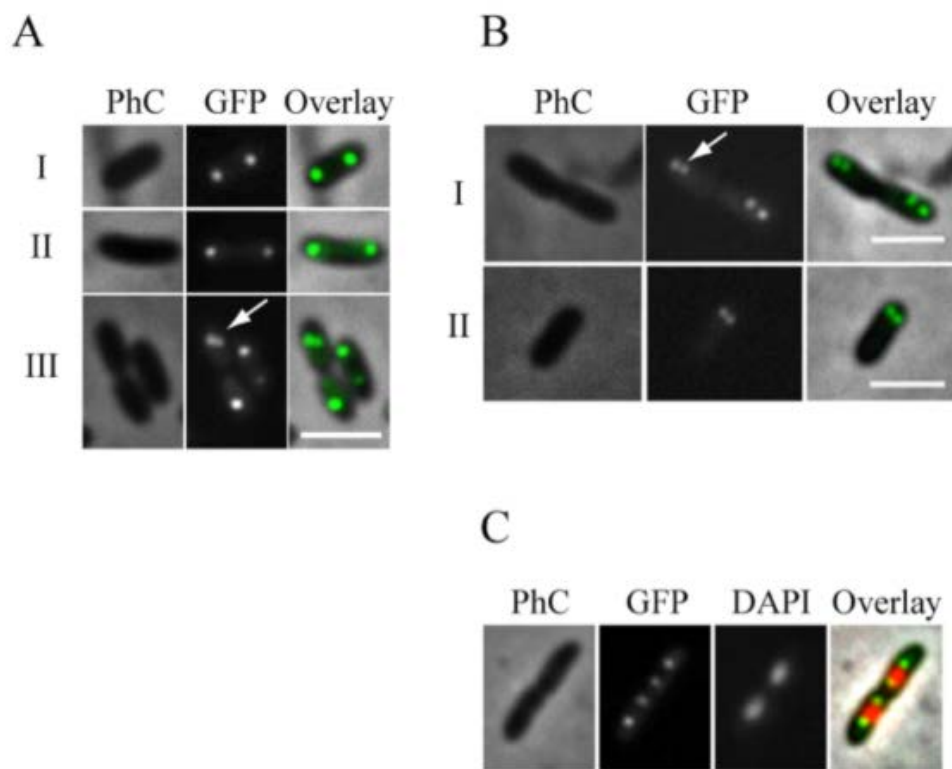


Figura 5. Localização de ParB-GFP. O padrão de localização de ParB-GFP foi analisado em diferentes células da linhagem *Xac parB::pAPU3* que expressa ParB-GFP através do promotor nativo *pparAB*. Os painéis A), B) e C) representam diferentes momentos em que a linhagem *Xac parB::pAPU3* foi observada. Células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3, imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1% e visualizadas utilizando microscopia de contraste de fase (PhC) e de fluorescência (GFP e DAPI). O foci ParB-GFP está marcado em verde e o nucleóide em vermelho. Barras de escala correspondem a 20 μm.

um novo evento de replicação em um compartimento celular (manifestando-se em estágios de septação tardia), o que evidencia uma assincronia no processo de iniciação da replicação do cromossomo nestas células. No entanto, também foram encontrados outros tipos de localizações em que as células pareciam estar em sincronia, levando em consideração a iniciação da replicação (Figura 5B). Na Figura 5B-I, pode-se notar células que estão em processo em divisão, e nestas, o posicionamento dos foci ParB-GFP estão bem próximos um do outro em um mesmo compartimento celular (portanto em apenas uma das regiões dos pólos). Neste caso, novos eventos de replicação que poderiam separar as regiões de origem dos cromossomos estão nos pólos, por isso os replissomos devem estar por perto. O fenótipo celular documentado na Figura 5B-II (células que não estão em processo de divisão) corroboram com o fato de que as origens em Xac iniciam a replicação em direção a um dos pólos celulares, como os padrões de replicação mostrados em *C. crescentus* e *Vibrio cholera* e diferindo dos padrões encontrados nos sistemas de *B. subtilis* e *E. coli* (Lau et al., 2003, Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012). Para finalizar, foi realizada a marcação das células com DAPI para a captura de indivíduos em estágios tardios de fechamento de septo e posicionamento de foci de ParB-GFP (Figura 5C) nas células. Nestas observações foi encontrado quatro foci de ParB-GFP uniformemente distribuídos dentro de dois compartimentos celulares ligados, onde ParB-GFP co-localiza com as bordas do nucleóide. Considerando por analogia a *B. subtilis* e outras referências (Glaser et al., 1997, Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012) que as bordas das células abrangem as origens de replicação, *parS* de Xac também deve estar localizado nesta região (aproximadamente 3 Kb da origem do cromossomo de Xac) e portanto é esperado que ParB-GFP se ligue a esta região do cromossomo.

Na figura 5B-II, é evidenciado que Xac inicia sua replicação cromossômica próximo de um dos pólos celulares, sugerindo que a segregação cromossômica neste fitopatógeno é assimétrica, assim como proposto, por exemplo, para *C. crescentus*, *V. cholerae* e *Corynebacterium glutamicum* (Fogel & Waldor, 2006; Donovan et al. 2010; Ptacin et al. 2010). Portanto, com o objetivo de analisar detalhadamente o possível padrão assimétrico de segregação cromossômica em Xac, foram realizados experimentos de microscopia de fluorescência utilizando a técnica de time-lapse. Para tal, foi observada a dinâmica de ParB na linhagem Xac *parB::pAPU3* por um período de 40 minutos, como mostrado na Figura 6. De $t = 0$ até $t = 20$ minutos, as células

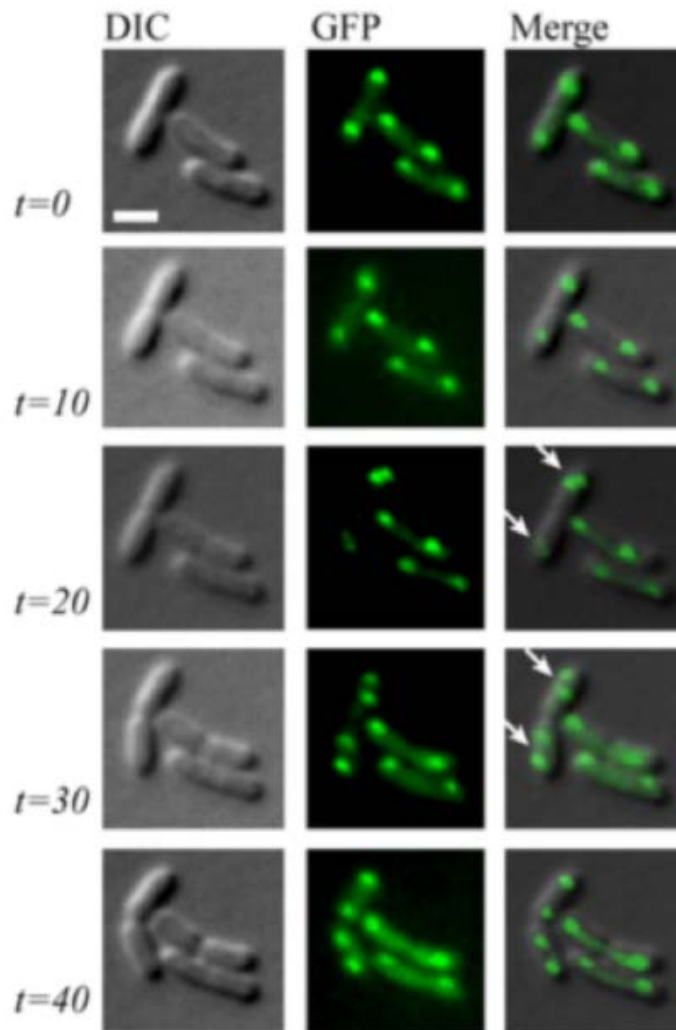


Figura 6. Time-lapse de ParB utilizando-se a linhagem *Xac parB::pAPU3*. A localização de ParB-GFP em *Xac parB::pAPU3* evidencia um padrão assimétrico para o modelo de partição cromossômica em *Xac*. Células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a $D.O_{600nm} \sim 0,3$ e fotografadas a 0, 10, 20, 30 e 40 minutos, como indicado. As flechas indicam o momento em que as origens de replicação se dividiram perto de um dos polos celulares (ver texto). Barra de escala corresponde a 4 μm .

mais a esquerda do painel iniciaram um novo evento de replicação cromossômica que pode ser visualizado pela divisão do foci de ParB-GFP (flechas em $t = 20$ min). No início do processo (do tempo $t = 0$ até $t = 20$), as origens de replicação, e consequentemente o foci ParB-GFP associado a elas, estavam localizadas perto de um dos polos celular e distantes do septo. Subsequentemente, do $t = 20$ ao $t = 40$ minutos, pode-se observar um foci ParB-GFP, inicialmente discreto e associado as origens de replicação, migrando a partir do ponto de duplicação em direção ao polo oposto (passando pela região onde o septo será formado); até alcançarem a região que se tornará o novo pólo após a citocinese. A dinâmica de ParB em *Xac parB::pAPU3*, mostrada neste experimento, confirmou o padrão de segregação cromossômica assimétrico em *Xac*. Modelos de segregação assimétrica foram documentados em microrganismos como *C. crescentus*, *V. cholerae* e *C. glutamicum* (Fogel & Waldor, 2006; Donovan et al. 2010; Ptacin et al. 2010), como supracitado no texto. No sistema mais bem caracterizado, descrito em *C. crescentus*, o cromossomo é orientado de maneira que a origem de replicação (designada *cori*) está próxima do velho pólo (sabe-se que células de *C. crescentus* exibem uma assimetria polar em que diversas proteínas e/ou sistemas são organizados em um mas não em ambos os polos ao mesmo tempo). Antes do início da replicação do DNA, ParB é ligado à região *parS*, que se localiza próxima à *cori*, e deste modo, ParB/*parS* organiza um centrômero (Toro et al., 2008) que é ancorado ao velho pólo pela proteína PopZ (Bowman et al., 2008; Ebersbach et al., 2008). Assim, quando o replicon é formado, o centrômero é duplicado e uma cópia desta região é capturada por filamentos de ParA que veem do pólo oposto, onde estavam ancoradas por TipN (fator que marca no novo polo) (Ptacin et al., 2010; Schofield et al., 2010). ParB/*parS* é capaz de interagir com ParA e, após esta interação, ParB estimula a despolimerização de ParA. Com a despolimerização de ParA, o filamento começa a encurtar, orientando deste modo, a migração do complexo ParB/*parS* em direção ao novo pólo celular, operando, desta forma, a segregação cromossômica neste microrganismo.

Outro sistema de segregação a este relacionado, é o proposto para *V. cholerae* (Fogel & Waldorf, 2006), o qual apresenta algumas diferenças em relação ao proposto por *C. crescentus*; como exemplo o uso de um distinto fator de ancoração polar designado HubP que interage com ParA (Yamaichi et al., 2012). Assim como para *C. glutamicum*, em que DivIVA foi demonstrado ser o fator que guia o complexo ParB/DNA ao pólo oposto (Donovan et al., 2012).

Finalmente, considerando as similaridades entre esses sistemas descritos, e em particular o padrão de localização subcelular de ParB-GFP documentados para *C. crescentus*, *V. cholerae* e *C. glutamicum*, provavelmente Xac também possui fatores com funções equivalentes às recém citadas.

Deleção de *parB* afeta viabilidade celular em Xac

Sabendo que ParB é uma proteína naturalmente expressa em Xac, foram avaliados outros fenótipos que pudessem inferir algumas funções desta proteína durante o processo de segregação cromossômica na bactéria. Para isso, foi realizado o nocaute de *parB* a fim de investigar se a proteína por ele codificada é essencial no mecanismo de segregação cromossômica em Xac. Assim, para esta deleção no genoma foi usado o vetor suicida pNPTS138 que contém gene de resistência à canamicina e o gene levansucrase, *sacB* (Alley, D., dados não publicados).

Como descrito em material e métodos, para realizar a deleção de *parB* foram amplificadas as regiões flancoadoras do gene e inseridas em pNPTS138, de maneira que a construção final, pNPTS- Δ parB, mantivesse a deleção do gene em estudo. Tal construção foi utilizada para eletrotransformar células da linhagem selvagem de Xac. Após transformação com pNPTS- Δ parB, as colônias resultantes do primeiro evento de recombinação foram selecionadas em placas de Petri contendo meio LB suplementado com canamicina, e posteriormente, as resultantes do segundo evento de recombinação foram selecionadas em meio contendo sacarose. As colônias que desta vez cresceram na presença de 3% sacarose foram novamente repicadas em placas contendo ou não canamicina. Para a confirmação do nocaute, vários clones resistentes a sacarose e sensíveis a canamicina foram analisados por PCR, porém, dentre as centenas de colônias avaliadas, em nenhuma delas foi observado o nocaute do gene. O experimento foi repetido por diversas vezes, e em todas foi notado a presença de *parB* no genoma, mostrando a dificuldade na obtenção de um mutante deficiente para a expressão de *parB* em Xac. Notando-se esta dificuldade da deleção de *parB*, foi decidido repetir o experimento na presença de cópia extra do gene. Assim, a linhagem de Xac WT foi transformada com o plasmídeo vazio, pMT335 (gerando a linhagem Xac pMT335), ou então com o plasmídeo pMT335-*parB* (gerando a linhagem Xac pMT335-*parB*), que codifica cópias extras de *parB*. O procedimento para a deleção

do gene nas linhagens Xac pMT335 e Xac pMT335-parB foi realizado como descrito em material e métodos, porém com a adição de gentamicina no meio de cultura. Após a seleção das colônias que realizaram o duplo evento de recombinação homóloga, vários clones foram novamente avaliados por PCR para a comprovação da deleção do gene. Como pode ser observado na Figura 7, todos os clones da linhagem Xac pMT335 analisados mantiveram *parB* intacto no genoma (comprovado pelas bandas em gel de agarose correspondentes aos fragmentos de 3236 pb, que são referentes ao tamanho do gene *parB* e suas regiões flanqueadoras); resultado que era esperado após as prévias tentativas sem sucesso de nocaute na linhagem de Xac WT. Interessantemente, em metade dos clones da linhagem Xac pMT335-parB analisados foram amplificados fragmentos de 3236 pb após PCR (caso em que novamente não ocorreu a dupla recombinação) porém, na outra metade houve a amplificação de fragmentos de 2345 pb, tamanho que comprova a deleção do gene na nova linhagem obtida (Xac Δ parBchr pMT335-parB). O fato da deleção de *parB* por dupla recombinação ter ocorrido em células que contém o plasmídeo pMT335-parB e não em células que carregam somente o plasmídeo pMT335 vazio sugere que ParB pode ser essencial em Xac. A presença de proteínas extras, codificadas pelo plasmídeo pMT335-parB, provavelmente consegue manter o fenótipo selvagem na linhagem Xac Δ parBchr pMT335-parB permitindo a viabilidade celular. Sabe-se que a depleção de ParB em células de *C. crescentus* resulta no bloqueio da divisão celular, fato que explica a letalidade dos mutantes nulos de *parB* e levando à interpretação de que esta proteína é requerida para o desempenho de tal função (Mol et al, 2001). Além de ser essencial em *C. crescentus*, foi demonstrado que ParB também é essencial em outros organismos como *V. cholerae* e *Myxococcus xanthus*, por exemplo (Yamaichi, et. al., 2007; Harms, et al. 2013). Desta forma, o fato do nocaute de *parB* em Xac ter ocorrido somente na linhagem que expressa cópia extra é um forte indício de que ParB seja uma proteína essencial em Xac.

Como não foi possível obter mutantes nulos de *parB* em Xac (sem a expressão de cópias extras que pudessem complementar a ausência da proteína codificada pelo genoma) e a fim de poder prosseguir com os estudos funcionais para a caracterização do gene, foi decidido construir um mutante que expressa, portanto, somente formas truncadas de ParB. Esse experimento foi realizado a partir da transformação de Xac com o vetor suicida pAPU2 que contém o fragmento correspondente a *parB*124-769.

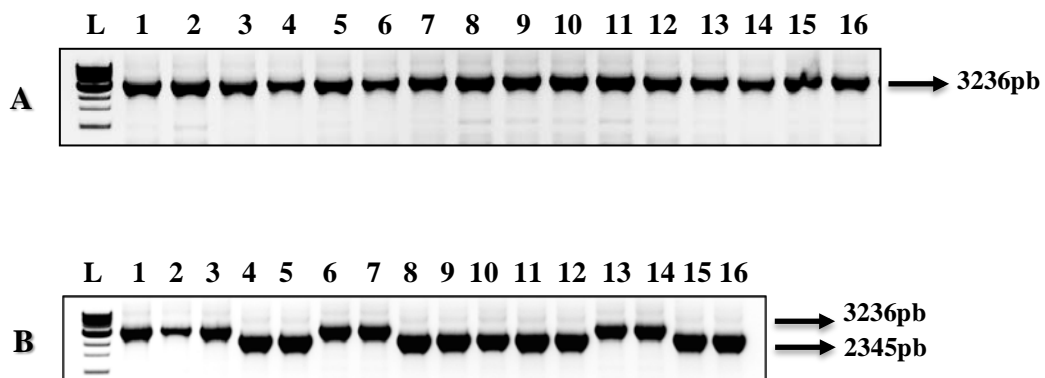


Figura 7. Deleção de *parB* no cromossomo de *Xac*. Após transformação com o plasmídeo suicida pNPTS Δ *parB* as linhagens foram selecionadas utilizando canamicina e sacarose e submetidas a reação de PCR para a confirmação da deleção do gene. **A)** Canaletas L, marcador de peso molecular (NEB 1 Kb) e 1-16, clones analisados que não realizaram a dupla recombinação (linhagem *Xac* pMT335). **B)** Canaletas L, marcador de peso molecular (NEB 1Kb), 1, 2, 3, 6, 7, 13 e 14, clones analisados que não realizaram a dupla recombinação (linhagem *Xac* pMT335-*parB*) e 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15 e 16, clones analisados que realizaram a dupla recombinação (linhagem *Xac* pNPTS Δ *parB*chr pMT335-*parB*).

Após integração do vetor no locus *parB* (Figura 8B) duas formas do gene poderiam surgir na nova linhagem de Xac construída (*Xac parB::pAPU2*): uma delas sobre o controle do promotor nativo de *parAB*, porém com a sequência codificadora para os resíduos 52 C-terminal de ParB ausentes (equivalente a ParB Δ C52, contendo uma adição do DNA que codifica para 18 resíduos do DNA plasmidial (Figura 8B)), e uma segunda forma que pode ser expressa somente pela atividade de *plac* de pAPU2 que codifica para LacZa-ParB (equivalente a LacZa1-26-ParB42-308, que corresponde à deleção dos primeiros 41 aminoácidos de N-terminal de ParB, ParB Δ N41). Embora ParB Δ C52 contenha o predito motif Helix-turn-helix (HTH) (Figura 8B; os resíduos 158-179 foram identificados usando GYM2.0 (Narasimhan et al., 2002)), não é esperado que esta proteína seja capaz de formar dímeros, podendo deste modo comprometer a sua ligação ao DNA (por analogia aos dados de caracterização bioquímica de Spo0J Δ 20), em comparação com a deleção de C-terminal de ParB de *Thermus thermophilus*; (Leonard et al., 2004, Murray et al., 2006). Motifs HTH normalmente são encontrados em proteínas que se ligam ao DNA e que regulam a expressão gênica. Tal motif consiste em aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos e é caracterizado por 2 α -hélices, as quais permitem o contato com o DNA. Uma das hélices ajuda na estabilização da estrutura e a outra se liga ao DNA através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

A segunda possível forma expressa na mesma linhagem, ParB Δ N41, caso consiga enovelar/expressar corretamente, a sua habilidade de interação e/ou estímulo da atividade do seu parceiro ParA também pode estar comprometida, como demonstrado no sistema ParAB de *T. thermophilus* (Leonard et al., 2005). Após a integração do plasmídeo, o contexto genômico ao redor do locus *parB* de três mutantes *Xac parB::pAPU2* independentes foi analisado por Southern blotting (Figura 8C). A observação da banda de hibridização diagnóstico de 4560 pb confirmou a alteração do locus.

Notavelmente, as três linhagens mutantes analisadas exibiram uma taxa de crescimento menor quando comparada com a linhagem selvagem. Estes mutantes conseguiram recuperar a resistência à canamicina em aproximadamente 5 dias após a transformação, enquanto colônias de Xac selvagem tornam-se visíveis em até 48h. A curva de crescimento destes três mutantes mostrou um tempo de duplicação mais lento nas primeiras 24 horas, conseguindo somente ser capaz de alcançar a cultura limite ($D.O_{600nm} \sim 2$) após 30 horas de cultivo, resultado que contrasta com o tempo

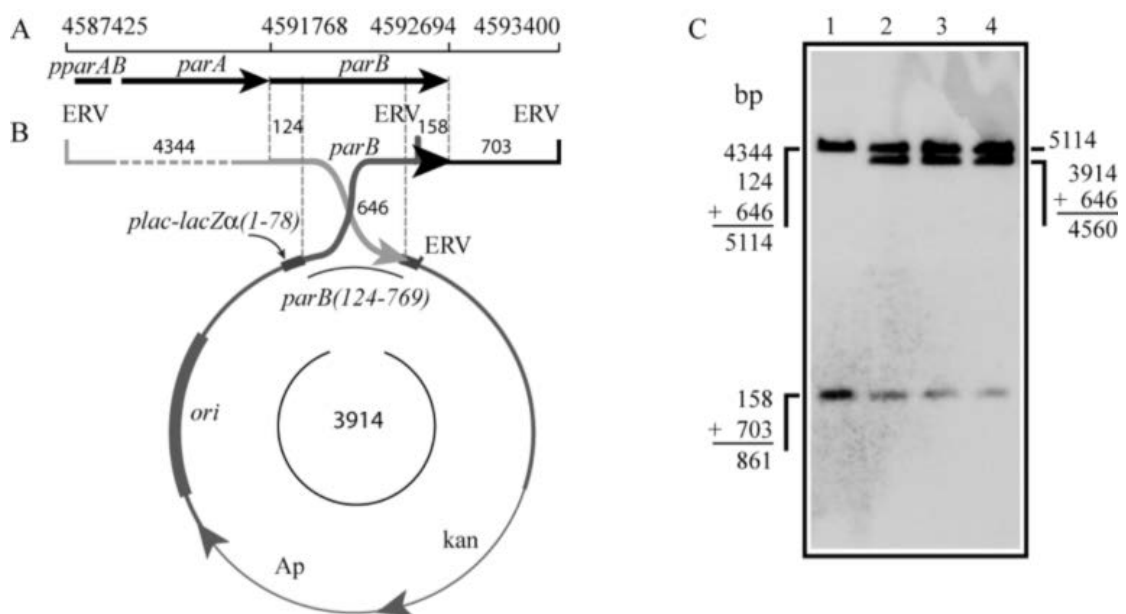


Figura 8. Estratégia de interrupção de *parB* em *Xac*. O vetor suicida pAPU2 que contém o fragmento *parB*₁₂₄₋₇₆₉ foi integrado no locus *parB* de *Xac*. **A)** Coordenadas genômicas de *parAB*. **B)** Esquema da integração: após inserção do plasmídeo, duas novas formas de ParB foram geradas: uma que codifica para ParBΔN41, fusão entre os primeiros 26 aminoácidos de LacZα mais os resíduos 42-308 de ParB e outra forma que codifica para ParBΔC52, aquela que não contém os resíduos 52 C-terminal de ParB porém possui a adição de novos 18 aminoácidos. Os números acima do mapa e em volta do círculo indicam os tamanhos dos fragmentos e suas delimitações; o motif predito helix-turn-helix de ParB está retratado abaixo da figura; ERV, sítios de restrição *EcoRV*. **C)** Análise de Southern blotting: DNA total de três linhagens mutantes *Xac parB::pAPU2* foi digerido com *EcoRV* e hibridizado com sonda *parB*. Os tamanhos dos fragmentos hibridizados detectados correspondem àqueles estimados com base nas coordenadas genômicas mostradas em B.

de 18h utilizado pela linhagem selvagem (Figura 9). A taxa de crescimento reduzida da linhagem *Xac parB::pAPU2* sugere novamente o envolvimento de ParB de *Xac* no processo de segregação cromossômica da bactéria.

Nessa linhagem, formas truncadas da proteína, caso realmente estejam sendo expressas, provavelmente atrapalham a partição fiel do cromossomo, resultando no retardamento da duplicação celular observado.

Disrupção de *parB* elimina virulência em *Xac*

Sendo um patógeno, a habilidade de colonizar o hospedeiro é um processo vital para *Xac*. Como mostrado anteriormente, a disrupção de *parB* alterou o padrão de crescimento das linhagens mutantes *Xac parB::pAPU2* em meio rico, portanto foi questionado se estas células ainda estariam aptas a colonizar citros. Assim, com o objetivo de responder esta questão, os mutantes *Xac parB::pAPU2* foram infiltrados na superfície abaxial de folhas de limão cravo juntamente com a linhagem selvagem. Após aproximadamente 30 dias foi possível notar que a região inoculada com a linhagem selvagem de *Xac* desenvolveu lesões com hipertrofia e hiperplasia e vários cancros próximos à região infiltrada, enquanto que a área inoculada com os mutantes *Xac parB::pAPU2* não apresentaram os sintomas típicos do cancro cítrico (Figura 10). A disrupção de *parB* em *Xac*, além de ter mostrado o fenótipo de retardamento do tempo de duplicação celular, promoveu a perda de virulência *in planta*. A disrupção, ausência e/ou super expressão de proteínas tipo ParB em muitos microrganismos, entre eles *C. crescentus*, *C. glutamicum* e *Pseudomonas aeruginosa*, pode acarretar em efeitos pleiotrópicos. Alguns exemplos destes efeitos podem ser a filamentação, perda de motilidade e perturbações em processos básicos como segregação cromossômica e divisão celular (Bartosik et al., 2009, Donovan et al., 2010, Mohl & Gober, 1997). Para *B. subtilis*, organismo modelo em que o sistema ParAB também vem sendo extensivamente caracterizado, modificações em proteínas Par resultam em alterações amenas, porém detectáveis, durante o crescimento vegetativo (Ireton et al., 1994). Neste estudo, o fenótipo de perda de virulência observada em *Xac parB::pAPU2*, relacionado a alterações no gene *parB*, pode ser consequência de pelo menos duas razões relacionadas ao segregossomo: 1) alterações metabólicas e/ou, e 2)

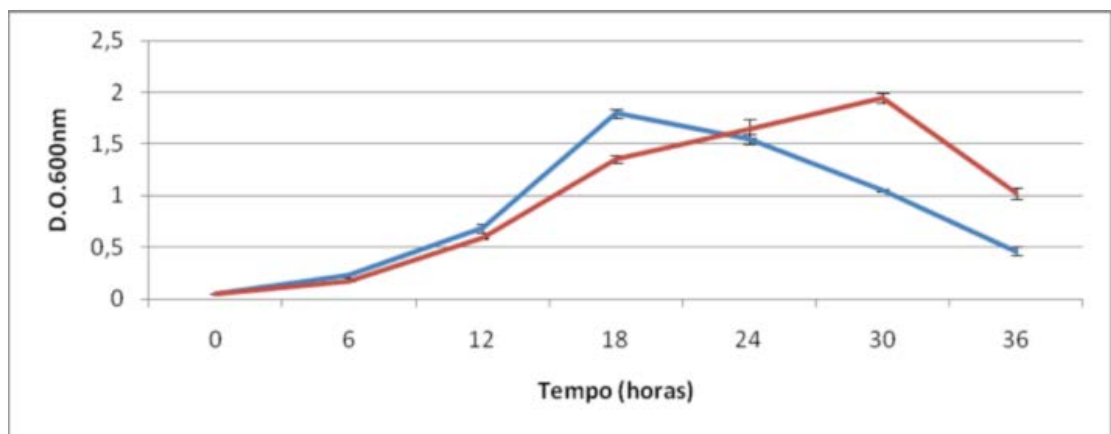


Figura 9. Curva de crescimento da linhagem mutante *Xac parB::pAPU2*. As culturas bacterianas foram cultivadas por 36h em meio LB a 30°C e 200 rpm. Cada ponto do gráfico corresponde a uma média de densidade óptica (D.O._{600nm}) calculada a partir de três experimentos diferentes. Barra vertical indica o desvio padrão calculado para cada média. Em azul, *Xac* selvagem e em vermelho, *Xac parB::pAPU2*.

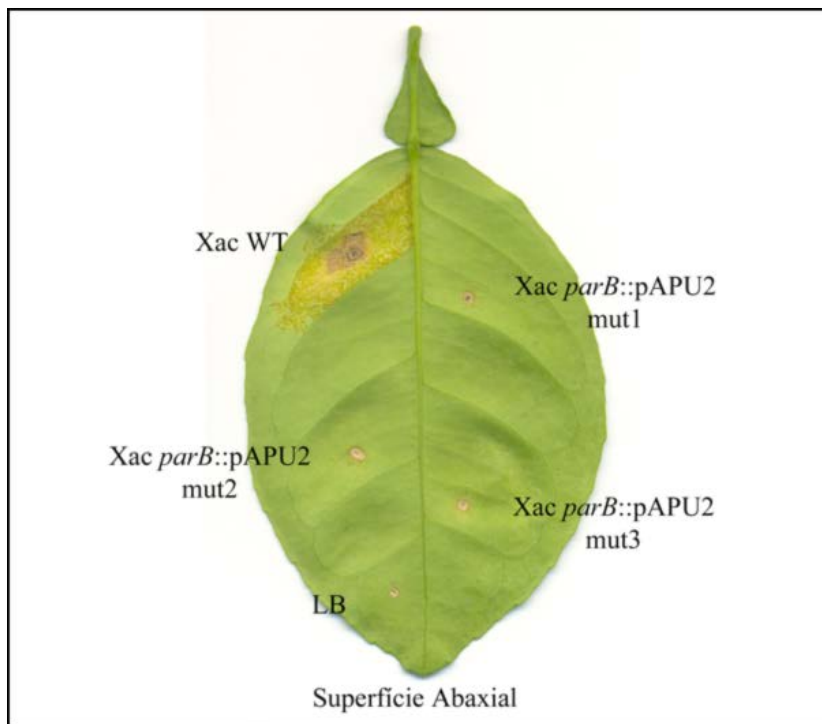


Figura 10. Mutantes de *Xac* com interrupção no gene *parB* mostram eliminação da virulência. A linhagem selvagem (*Xac* WT) e três linhagens mutantes *Xac parB::pAPU2* foram inoculadas em folhas de limão cravo juntamente com a linhagem selvagem de *Xac* e o diluente LB. Plantas inoculadas foram mantidas em estufa por um período de 30 dias com o objetivo de avaliar o aparecimento dos sintomas do cancro cítrico. O experimento foi realizado em triplicata.

perturbação nos sistemas de patogenicidade e em fatores indiretamente desencadeados pela disrupção de *parB*. Foi demonstrado recentemente por Silva et al. (2013) que ésteres de galatos de alquila são capazes de interferir na localização subcelular de ParB em *Xac*, provavelmente perturbando a segregação cromossômica bacteriana. A inabilidade em induzir os sintomas do cancro cítrico do mutante *Xac parB::pAPU2* é um dado inédito que corrobora com os dados de Silva et al. descritos em 2013. Juntos, esses resultados revelam indícios de uma possível relação entre segregação cromossômica e patogenicidade em *Xac*, realçando possíveis bom alvos antimicrobianos contra o cancro cítrico.

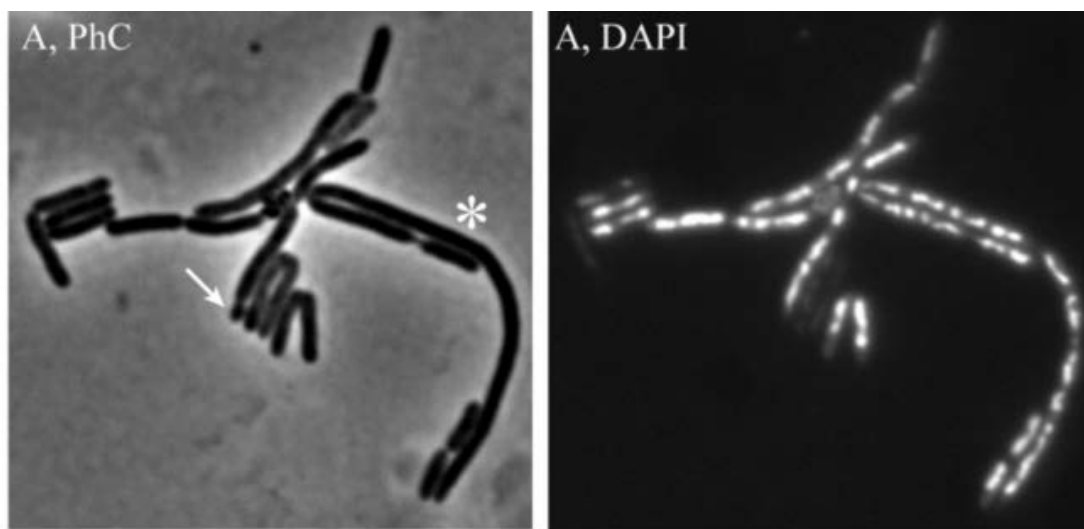
Disrupção de *parB* altera morfologia de *Xac*

Para continuar a investigação das funções de ParB de *Xac*, mutantes foram avaliados pela utilização de técnicas de microscopia a fim de detectar quaisquer mudanças morfológicas nas células que poderiam justificar defeitos na segregação da linhagem *Xac parB::pAPU2*.

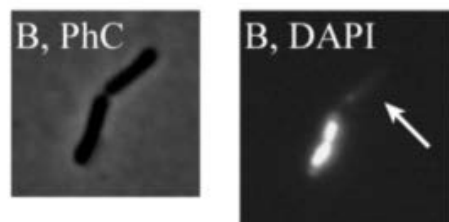
Após a disrupção gênica de *parB*, culturas da linhagem *Xac parB::pAPU2* mostraram uma mistura de células que filamentaram e células que formaram cadeias (Figuras 11 e 12). A percentagem dos tipos celulares em meio de cultura está descrito na Tabela 3. Em culturas realizadas em meio LB, aproximadamente 5% da linhagem *Xac parB::pAPU2* mostrou a formação de longos filamentos e 30% de formação de cadeias celulares (n=400). Estudos mais detalhados das células que filamentaram mostraram a presença de constrições para a formação de septo (Figura 11 marcado com um asterisco). O padrão de divisão mostrado indica que uma célula começou a crescer e conseguiu se dividir normalmente, contudo, nos sucessivos ciclos celulares, elas perderam a habilidade de formar o septo e se dividir normalmente, ponto em que se iniciou a filamentação; no entanto, as células mais velhas ainda mantiveram-se nas pontas dos filamentos. Assim, apesar destes mutantes estarem crescendo como longos filamentos, a maquinaria de divisão parece estar ativa nestas células.

Em relação às células da linhagem *Xac parB::pAPU2* que não filamentaram, claramente elas mostram uma alongação celular quando comparada com a linhagem selvagem. Deste modo, a fim de avaliar este fenótipo quantitativamente, foram medidas 200 células de cada cultura bacteriana (linhagens *Xac WT* e *Xac parB::pAPU2*) e, após o cálculo do tamanho das células, foi notificado que a média

A



B



C

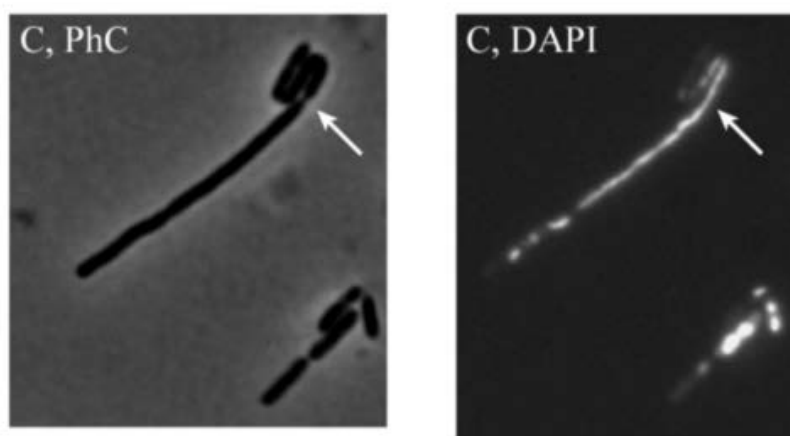
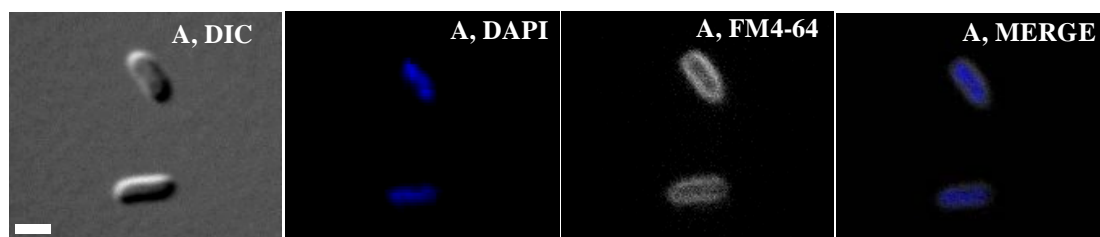


Figura 11. Fenótipo de filamentação dos mutantes *Xac parB::pAPU2*. Morfologia da linhagem mutante *Xac parB::pAPU2* visualizada em contraste de fase (PhC) e microscopia de fluorescência de células marcadas com DAPI (DAPI). Os painéis **A**, **B** e **C** representam diferentes campos fotografados. A linhagem mutante foi cultivada em meio LB a 30°C e a observação foi realizada em torno da $D.O_{600nm} \sim 0,3$. As células foram imobilizadas em laminas cobertas com gel de agarose 1%. As flechas e asterisco indicam alterações fenotípicas discutidas no texto.

A



B

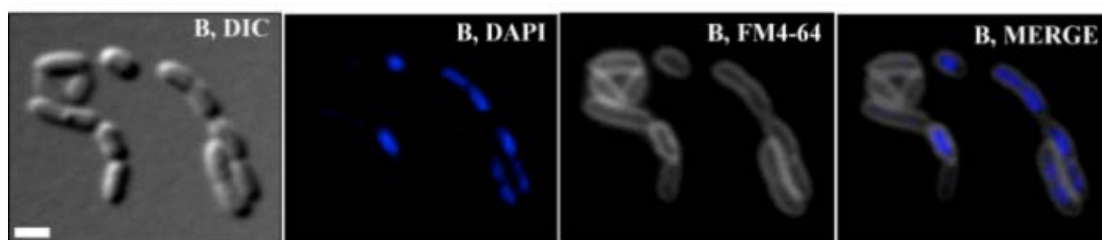


Figura 12. Análise morfológica da linhagem *Xac parB::pAPU2*. A linhagem *Xac parB::pAPU2*, que expressa formas truncadas de ParB foi comparada com *Xac* WT por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e microscopia de fluorescência. Membrana e nucleóide foram marcados com FM 4-64 e DAPI, respectivamente. **A)** *Xac* WT. **B)** *Xac parB::pAPU2*. As linhagens foram cultivadas em meio LB a 30°C e visualizadas na D.O. $_{600\text{nm}} \sim 0.3$; células foram imobilizadas em lâminas cobertas com gel de agarose 1%. As barras de escala correspondem a 4 μm .

Tabela 3. Análise morfológica de *Xac parB::pAPU2*

Linhagem	Tamanho Celular	Células sem nucleóide
<i>Xac</i> WT	1,44 $\mu\text{m} \pm 0,31$	0
<i>Xac parB::pAPU2</i>	2,56 $\mu\text{m} \pm 0,42^*$	30%

Os dados correspondem ao tamanho médio celular e desvio padrão (\pm)

* $P < 0,05$, One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey.

do tamanho celular foi significativamente diferente entre elas. As células da linhagem selvagem de *Xac* mostraram uma média de tamanho de $1,44 \text{ mm} \pm 0,31$ enquanto a média do tamanho da linhagem *Xac parB::pAPU2* foi de $2,56 \text{ mm} \pm 0,42$.

A fim de continuar as avaliações dos efeitos da interrupção de *parB* na organização do cromossomo de *Xac parB::pAPU2*, células foram marcadas com 4',6-diamino-2-fenilidol (DAPI) e visualizadas por microscopia de fluorescência (Figuras 11 e 12). Como resultado da marcação do nucleóide foi observado um acúmulo de massa cromossomal nas células de maneira aparentemente desordenada (Figura 11A), e em alguns casos assumindo uma forma contínua, onde o nucleóide se estende e preenche todo o filamento; prevenindo o fechamento do septo (flechas em Figura 11B).

Mini células também puderam ser detectadas nas observações, contudo não tão frequentemente (flecha em Figura 11A). Finalmente, também foi detectado nas culturas de *Xac parB::pAPU2* um grande número de células sem nucleóide (Figura 12B) nos campos observados. Estas exibiram aproximadamente 30% de células sem material genético, o que contrasta com a linhagem selvagem de *Xac* (Tabela 3).

Este defeito de divisão celular mostrado em *Xac parB::pAPU2* pode ser resultante da perda de controle de localização de septo, fenótipo descrito para *C. crescentus* (Thanbichler & Shapiro, 2006). Neste organismo, ParB é requerido para que MipZ possa realizar sua função (que atua como um fator que opera na seleção do sítio de divisão celular), e a falta e/ou desbalance de ParB resulta tanto na filimentação celular quanto em divisões celulares aberrantes, como por exemplo o aparecimento de mini células. Outra possibilidade plausível que possa ter causado a filimentação em *Xac parB::pAPU2* é a ação de sistemas de oclusão de nucleóide, análogo ao sistema Noc/SlmA de *B. subtilis* e *E. coli*, por exemplo (Wu & Errington, 2004; Bernhardt & de Boer, 2005). Como mostrado na Figura 11, a replicação cromossômica na linhagem *Xac parB::pAPU2* seguida de uma inadequada segregação aparentemente produz células com várias cópias cromossomais que, caso associada com fatores de inibição de formação/fechamento do septo, poderiam acarretar na filimentação. Contudo, ainda não foi observado no genoma de *Xac* sistemas análogos que possam codificar para proteínas tipo Noc/SlmA para realizar a função de fatores de oclusão do nucleóide (Wu & Errington, 2004; Bernhardt & de Boer, 2005).

Em suma, os dados obtidos indicam que a interrupção de *parB* em *Xac* acarreta em um severo dano no processo de segregação e na inesperada perda da habilidade de

causar os sintomas do cancro cítrico. Além disso, pode-se antecipar que é possível haver uma ligação entre o processo de partição cromossômica e divisão celular no patógeno, pois a filamentação da linhagem mutante *Xac parB::pAPU2* acompanhou uma severa desorganização cromossomal, como já mostrado em para *C. crescentus* (Thanbichler & Shapiro, 2006).

ParB de *Xac* possui atividade semelhante a ParB de *C. crescentus*

A fim de aprofundar os estudos utilizando a linhagem *Xac parB::pAPU2*, duas tentativas de complementação funcional foram realizadas. Para isso, a linhagem *Xac parB::pAPU2* foi eletroporada ou com o plasmídeo pBBR1MCS5-*parAB*, o qual contém a sequência inteira do operon *parAB* e seu promotor nativo (*Xac parB::pAPU2* pBBR1MCS5-*parAB*), ou com o plasmídeo pCW510-*parB*, o qual expressa a fusão ParB-GFP governada pelo promotor de vanilato (*Xac parB::pAPU2* pCW510-*parB*). Observações ao microscópio das linhagens *Xac parB::pAPU2* pBBR1MCS5-*parAB* e *Xac parB::pAPU2* pCW510-*parB* revelaram que não houve complementação na linhagem contendo a interrupção de *parB*. Mesmo após a introdução de *parB* intacto na célula, sabidamente funcional, a linhagem manteve o fenótipo de formação de cadeia e alongação celular. Nota-se, na Figura 13, que a linhagem mutante *Xac parB::pAPU2* pCW510-*parB* (que expressa ParB-GFP) não possui o típico padrão de localização subcelular para o foci da fusão proteica mencionada. ParB-GFP em *Xac parB::pAPU2* pCW510-*parB* apresenta localização difusa na célula, cujo fenótipo pode ser explicado pelos seguintes motivos: impedimento de uma correta interação com o DNA (causada pela massa cromossomal desordenada que essa linhagem possui); uma possível competição com as proteínas truncadas ou ainda, pelo comprometimento da atividade de ParA devido a sua ausência ou a incorreta interação proteica ParA/ParB. Resultado semelhante foi observado em *P. aeruginosa*, em que linhagens mutantes contendo *parB* mutagenizado não puderam ser complementadas com a expressão *in trans* nem do gene *parB* nem de ambos os genes *parA* e *parB*, mesmo havendo níveis de ParA e ParB semelhantes ao da linhagem selvagem (Bartosik et al., 2009). Tais mutantes voltaram a mostrar o fenótipo selvagem (em relação a morfologia da colônia, taxa de

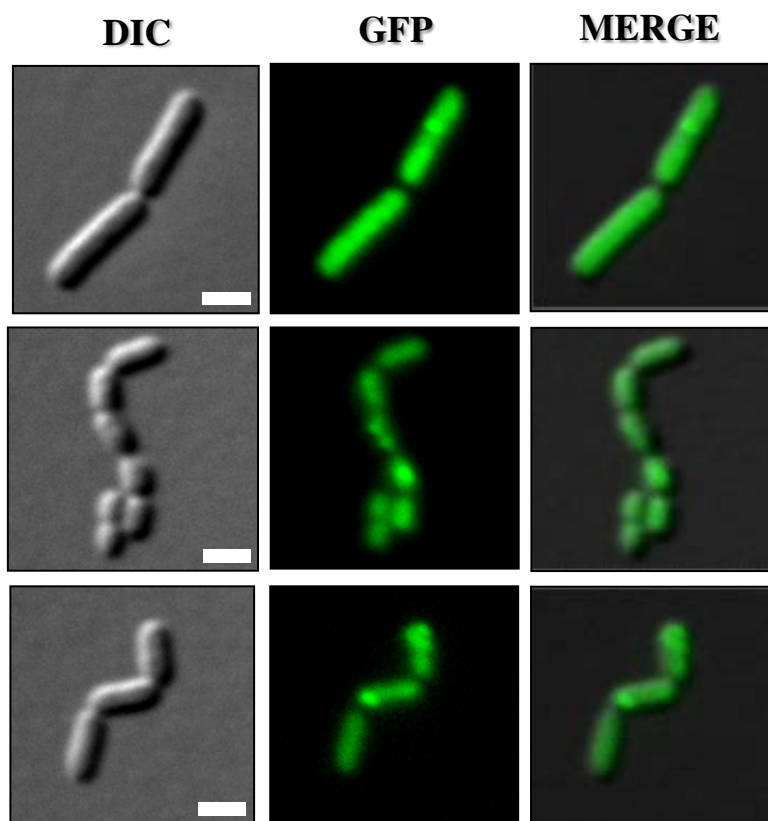


Figura 13. Localização de ParB-GFP na linhagem *Xac parB::pAPU2 pCW510-parB*. O padrão de localização de ParB-GFP foi analisado em diferentes células da linhagem *Xac parB::pAPU2*. Células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3, imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1% e visualizadas utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e de fluorescência (GFP). Barras de escala correspondem a 4 µm.

crescimento e tamanho celular) somente quando foi realizada a troca alélica de *parB* mutagenizado pela versão intacta de *parB* (mutante revertente) (Bartosik et al., 2009).

Como não foi possível obter a complementação na linhagem Xac *parB*::pAPU2, foi decidido inserir as duas formas truncadas de ParB (ParB Δ 52C e ParB Δ 41N) (Figura 14) em vetor de expressão a fim de investigar se apenas uma das duas versões proteicas poderia ser responsável pelo fenótipo encontrado nesta linhagem. Concomitantemente, uma terceira versão de ParB de Xac, ParB Δ 89N (Figura 14), baseada na versão da proteína truncada de ParB de *C. crescentus* (ParB Δ 80N) que possui efeito dominante negativo na bactéria (Figge et al., 2003) também foi inserida em vetor de expressão e eletroporada em Xac WT. Após eletroporação, três novas linhagens de Xac foram surgidas: Xac pMT335-ParB Δ 52C, Xac pMT335-ParB Δ 41N e Xac pMT335-ParB Δ 89N, as quais foram avaliadas morfológicamente. Para uma análise comparativa, também foram verificados os plasmídeos contendo as formas truncadas de ParB de Xac em *C. crescentus*. Assim, após transformações, as células foram crescidas em meio LB (Xac) ou PYI (*C. crescentus*) tanto na ausência quanto na presença de vanilato. Análises de microscopia das três linhagens de Xac geradas (Xac pMT335-ParB Δ 52C, Xac pMT335-ParB Δ 41N e Xac pMT335-ParB Δ 89N) revelou um padrão morfológico semelhante ao linhagem de Xac WT (Figura 15), independentemente do meio ter sido suplementado com o indutor ou não. Apesar das versões truncadas de ParB de *C. crescentus* (correspondentes as versões ParB Δ 41N e ParB Δ 89N de Xac) ter efeito dominante negativo nesta bactéria (Figge et al., 2003), o mesmo parece não ocorrer em Xac, pois nenhuma das três formas de ParB citadas acima foi capaz de alterar a morfologia celular. Em *C. crescentus*, a expressão de ParB Δ 89N também não mostrou alteração morfológica; diferentemente das versões ParB Δ 52C e ParB Δ 41N quando induzidas por vanilato (Figura 15B). O fato de ParB Δ 89N ter sido a única proteína mutante que não alterou os padrões morfológicos de *C. crescentus*, sugere uma possível inativação desta versão proteica e a atividade comprometida das versões ParB Δ 52C e ParB Δ 41N (Figura 15B). A super expressão de ParB em Xac parece não alterar a morfologia da bactéria (observado nas linhagens Xac *parB*::pAPU3 e Xac pMT335-*parB*), resultado que difere para *C. crescentus*, cuja alteração da expressão de ParB causa efeito tóxico, resultando na filamentação celular (Mohl & Gober, 1997). Curiosamente, ParB de Xac, quando inserida em *C. crescentus*, também ocasiona a filamentação das células

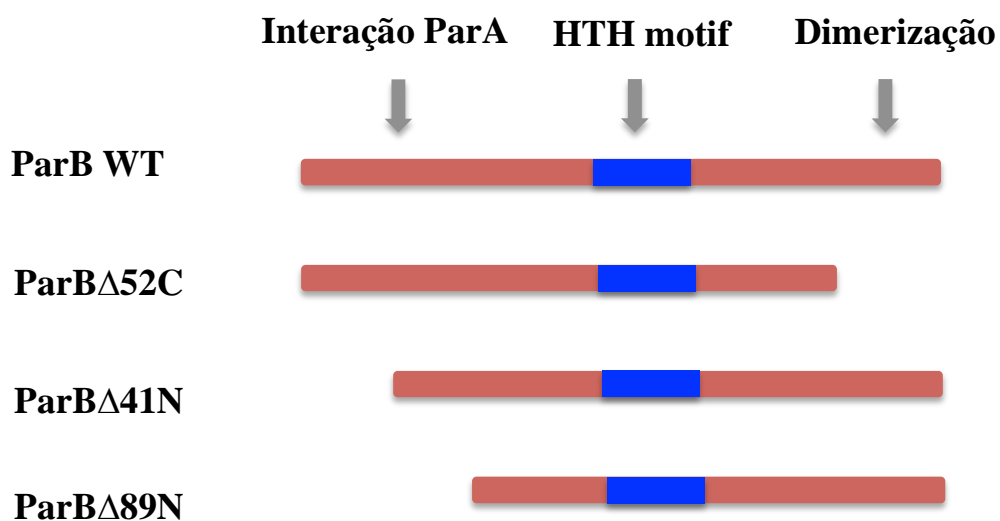


Figura 14. Versões da proteína ParB de *Xac*. Deleção de diferentes regiões de *parB*. ParB WT corresponde a proteína ParB intacta, ParB Δ 52C corresponde a versão de ParB sem 52 resíduos de aminoácidos da região carboxi-terminal, ParB Δ 41N corresponde a versão de ParB sem 41 resíduos de aminoácidos da região amino-terminal e ParB Δ 89N corresponde a versão de ParB sem 89 resíduos de aminoácidos da região amino-terminal. Os prováveis domínios de dimerização e interação com a proteína ParA estão indicados pelas flechas cinzas e o motif Helix-turn-helix (HTH) pela flecha cinza e pelo retângulo em azul.

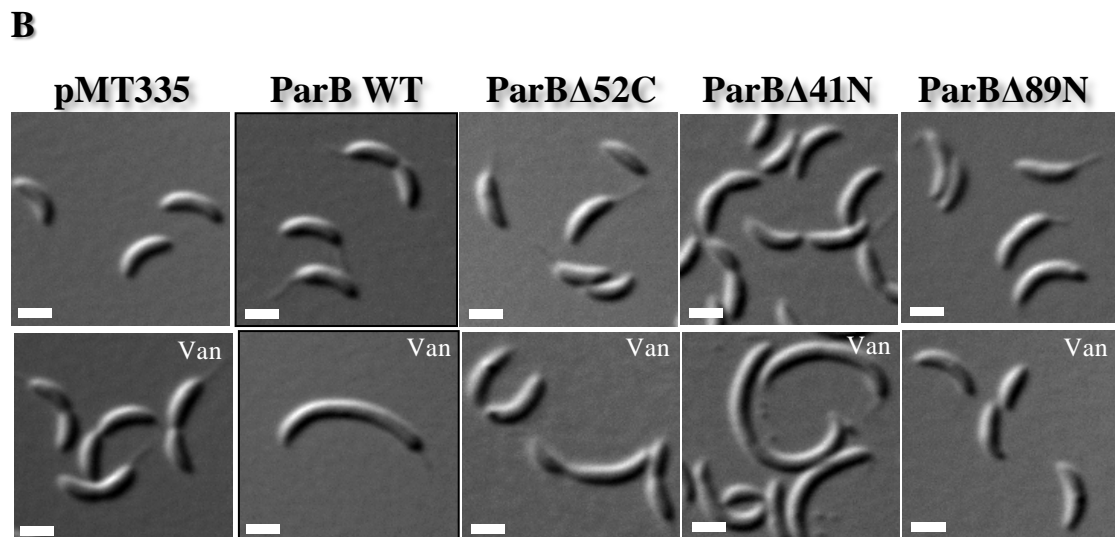
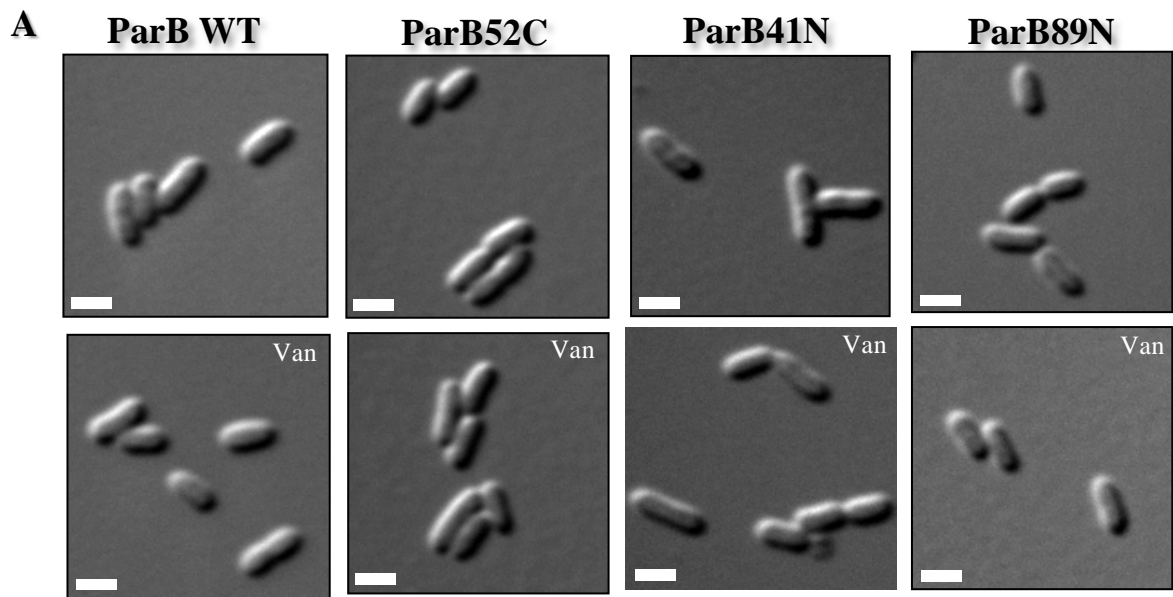


Figura 15. Linhagens de *Xac* e *C. crescentus* contendo formas truncadas da proteína ParB. As linhagens *Xac* WT e *C. crescentus* foram eletroporadas com diferentes versões de ParB de *Xac*. **A)** Morfologia das linhagens *Xac* WT (ParB WT), *Xac* pMT335- ParB Δ 52C (ParB Δ 52C), *Xac* pMT335-ParB Δ 41N (ParB Δ 41N) e *Xac* pMT335-ParB Δ 89N (ParB Δ 89N), **B)** Morfologia de *C. crescentus* eletroporadas com as versões de ParB de *Xac*: *C. crescentus* WT (WT), ParB WT (pMT335-parB), ParB Δ 52C (pMT335-parB Δ 52C), ParB Δ 41N (pMT335-parB Δ 41N), e ParB Δ 89N (pMT335-parB Δ 89N). As linhagens foram cultivadas em meio LB ou PYI a 30°C na ausência ou presença de vanilato (Van), imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1% e visualizadas utilizando microscopia em contraste de interferência diferencial (DIC). Barras de escala correspondem a 4 μ m.

(Figura 15). Esses resultados sugerem, portanto, uma atividade semelhante entre as proteínas tipo ParB dos dois microrganismos porém com funcionalidades distintas.

Como revelado na Figura 15, a indução da expressão de ParB Δ 52C, ParB Δ 41N ou ParB Δ 89N separadamente, parece não afetar a concentração de ParB WT na célula, sugerindo a preferência de ligação entre proteínas ParB WT. Caso a interação proteína nativa/proteína mutante esteja ocorrendo, esta parece não alterar o processo de segregação cromossômica em Xac. Sabe-se que não é possível a obtenção do nocaute de *parB* sem a presença de cópia extra; contudo, a interrupção genica pode manter as células vivas. Tal fato indica a probabilidade da expressão das variantes proteicas ParB Δ 41N e ParB Δ 52C poderem, de alguma maneira, formar complexos distintos na linhagem Xac *parB*::pAPU2 e realizar parte de sua função. Deste modo, apesar dos graves problemas de segregação cromossômica, a linhagem é capaz de manter a viabilidade celular. Caso este complexo entre as proteínas truncadas realmente esteja sendo formado na linhagem Xac *parB*::pAPU2, mesmo após a introdução de ParB WT ainda pode haver uma competição intracelular entre os complexos formados e o dímero de ParB em Xac. Essa possível competição entre os complexos formados pode manter o defeito da segregação cromossômica e o fenótipo aberrante observado, o que explica o fato da complementação não ter ocorrido.

Mutações pontuais em *parB* alteram a morfologia de Xac

Como não foi detectado nenhuma alteração na morfologia de células de Xac que expressam apenas uma das formas truncadas da proteína ParB, mutações sítio-dirigidas em *parB* foram realizadas a fim melhor inferir papéis desta proteína. Assim, sabendo que ParB pertence à família de proteínas Helix-turn-helix de ligações ao DNA sítio-específicas, a primeira mutagenese compreendeu dois resíduos de aminoácidos conservados encontrados nesse domínio: ParB_{R170A_S171A}. A segunda mutação realizada abrangeu dois resíduos de aminoácidos conservados que são requeridos para ligação ao DNA e atividade de spreading lateral em *B. subtilis* (Gruber & Errington, 2009): ParB_{R102A_N134A}. Deste modo, as duas versões mutagenizadas de *parB* foram inseridas no vetor pMT335 e eletroporadas na linhagem Xac WT gerando as linhagens Xac ParB_{R170A_S171A} e Xac ParB_{R102A_N134A}. Após observação ao microscópio, ambas as linhagens mostraram fenótipo similar ao

da linhagem Xac *parB*::pAPU2, ou seja, células alongadas e formação de células em cadeias (Figura 16). Este fenótipo mostrado pelas linhagens, Xac ParB_{R170A_S171A} e Xac ParB_{R102A_N134A}, revelam mais uma vez graves danos na segregação cromossômica de Xac.

Mutações específicas no motif HTH de proteínas tipo ParB comprovaram a atividade da proteína no processo de segregação cromossômica de vários microrganismos. Tais mutações em *P. aeruginosa* acarretam na alteração da morfologia da colônia, aumento do tamanho celular e diminuição da taxa de crescimento (Bartosick et al., 2009). Em *B. subtilis*, o resíduo de aminoácido N112 (N134 em Xac), é requerido para uma correta dimerização de Spo0J (Gruber & Errington, 2009). Já o resíduo de aminoácido R149 (R102 em Xac) está localizado pouco antes do motif HTH e é requerido para a especificidade de ligação do dímero de Spo0J ao DNA (Gruber & Errington, 2009). Ressalta-se que os resíduos de aminoácidos de ParB referentes aos N134, R112, R170 e S171 estão intactos nas três formas truncadas de ParB realizadas anteriormente (ParB Δ 52C, ParB Δ 41N e ParB Δ 89N), as quais não acarretaram em alteração morfológica celular. Sabendo que ParB de Xac e Spo0J de *B. subtilis* são proteínas tipo ParB e possuem 31% de identidade, os dados obtidos sugerem que provavelmente ParB de Xac também possa se ligar ao major groove do DNA (através do motif HTH) e realizar spreading lateral, assim como descrito para *B. subtilis* (Lin & Grossman, 1998, Murray et al., 2006).

As duas formas de ParB mutagenizadas também foram eletroporadas em *C. crescentus* para uma avaliação comparativa da atuação de ParB de Xac em ambas as bactérias. Como já relatado para a maioria das outras observações de *C. crescentus* portando diversas versões de ParB de Xac, mais uma vez uma brusca alteração da morfologia (filamentação) foi averiguada (Figura 16), sugerindo novamente a atividade semelhante de ParB de Xac e *C. crescentus*.

Por fim, as mutações realizadas em ParB de Xac sugerem uma relação entre os resíduos de aminoácidos supracitados com as atividades de ligação ao DNA e spreading lateral da proteína. Provavelmente a expressão destas versões mutadas da proteína resultaram na redução de tais atividades, comprometendo a segregação cromossômica da bactéria. Futuras localizações subcelulares e ensaios de EMSA, utilizando as proteínas contendo as mutações, poderão corroborar com a possível relação entre essas regiões conservadas e as funções de ParB de Xac.

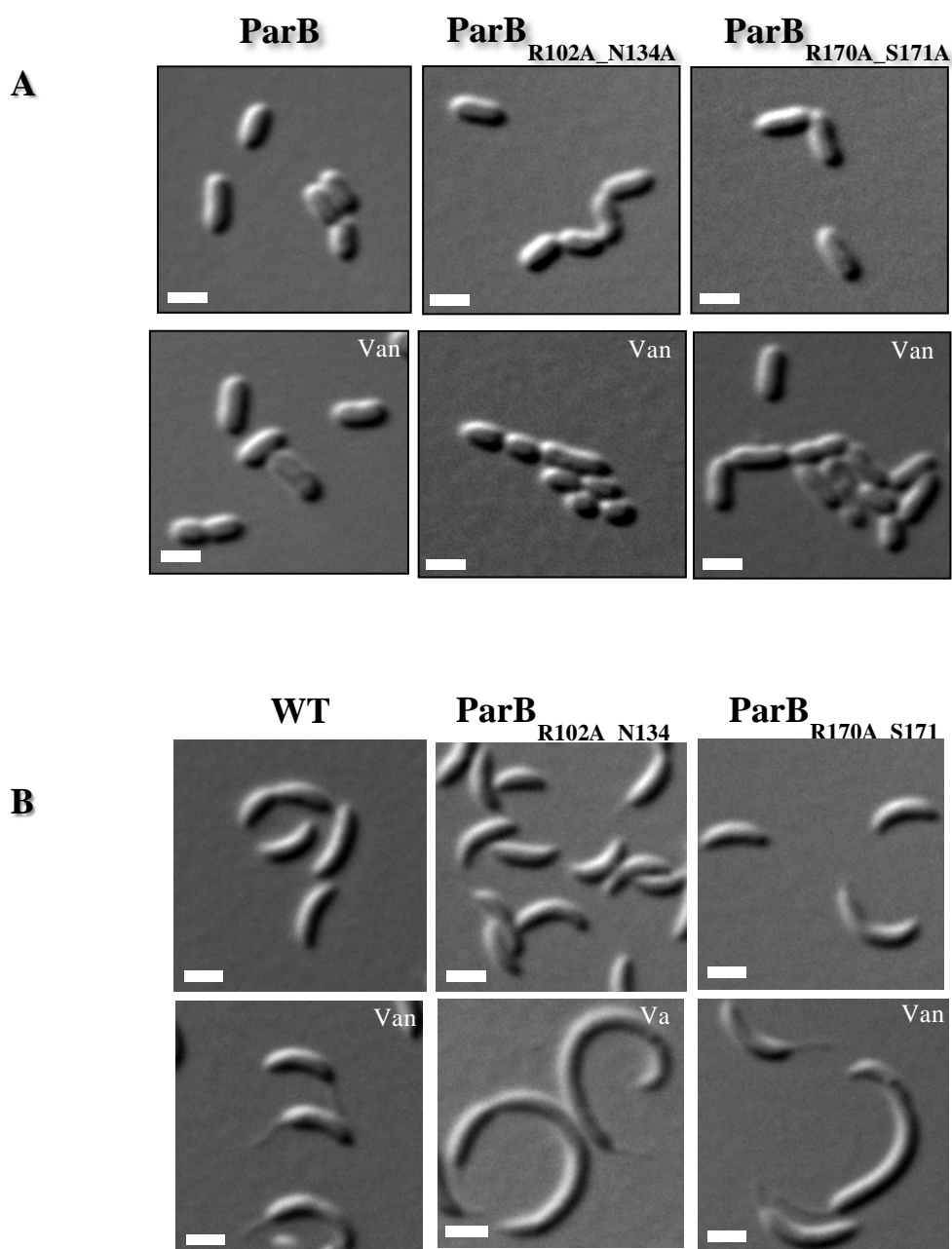


Figura 16. Mutações sítio-dirigidas em ParB afetam morfologia de Xac. Linhagens de Xac WT e *C. crescentus* foram eletroporadas com diferentes versões da ParB de Xac. **A)** Morfologia das linhagens de Xac WT (ParB WT), Xac ParB_{R170A_S171A} (ParB_{R170A_S171A}) e Xac ParB_{R102A_N134A} (ParB_{R102A_N134A}), **B)** Morfologia da linhagem selvagem de *C. crescentus* (WT) e *C. crescentus* transformada com pMT335-parB_{R170A_S171A} (ParB_{R170A_S171A}) e pMT335-parB_{R102A_N134A} (ParB_{R102A_N134A}). As linhagens foram cultivadas em meio LB ou PYI a 30°C na ausência ou presença de vanilato (Van), imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1% e visualizadas utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Barras de escala correspondem a 4 μm.

Propriedades de ligação ao DNA de ParB de Xac

Em busca de regiões *parS* disponíveis em genomas bacterianos, Livny et al. (2007) reportaram, através de análises de bioinformática que Xac tem pelo menos um deste elemento *cis* (TGTTCCACGTGGAACG; coordenada genômica c2753...2768) que está localizado na região 3' do gene *dnaA* do cromossomo. Dados de time-lapse previamente obtidos através de microscopia de fluorescência corroboram com a suposta localização da região *parS* no cromossomo de Xac (Livny et al., 2007). Assim, como membro da família ParB, a proteína ParB de Xac deve realizar algumas das características descritas no modelo cromossomal codificado pelo fator Spo0J de *B. subtilis*, por exemplo. Spo0J tem a habilidade de se ligar a *parS* e envolver o DNA através de spreading lateral iniciando em *parS* (Lin & Grossman, 1998, Murray et al., 2006). A fim de avaliar tais características, ParB-His6 de Xac foi purificada em linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS portando vetor pAPU4 (pET28a-*parB*), a partir de 1 L de cultura em meio LB. A linhagem foi induzida por 3h a 30°C, momento em que alíquotas foram retiradas para averiguação em SDS-PAGE (Figura 17A). Tendo obtido expressão considerável em 3h de indução, foi decidido continuar com este tempo de indução para os experimentos seguintes. Após a expressão proteica, a massa celular foi coletada por centrifugação, lisada com auxílio de um sonicador e aplicada em resina de Ni²⁺-chelating para uma primeira purificação. O padrão de purificação em resina de Ni²⁺ encontra-se na Figura 17B (canaletas 7-9), onde é possível notar que a proteína foi obtida quase homogênea. Porém, considerando que proteínas de ligação ao DNA sítio específica (como por exemplo XerC/D (Ferreira et al., 2001)) exibem uma afinidade natural por Heparina, ParB-His6 foi submetida a uma cromatografia com essa resina. Como resultado, a proteína ligada à resina foi eluída a uma força iônica de aproximadamente 600 mM (Figura 17C), um perfil equivalente ao observado para Spo0J-His6 (H. Ferreira & J. Errington, dados não publicados). O passo de Heparina usado para ParB-His6 foi realizado com o objetivo de eliminar algumas proteínas que supostamente estavam ligadas ao DNA e assim poderiam interferir nas análises de gel filtração. Deste modo, ParB-His6 foi então carregada em uma coluna Superdex200 e foi eluída em único pico com uma retenção de volume de aproximadamente 13,4 mL (Figura 18). Como o esperado, ParB-His6 foi eluída na mesma faixa de peso molecular (96-55 kDa)

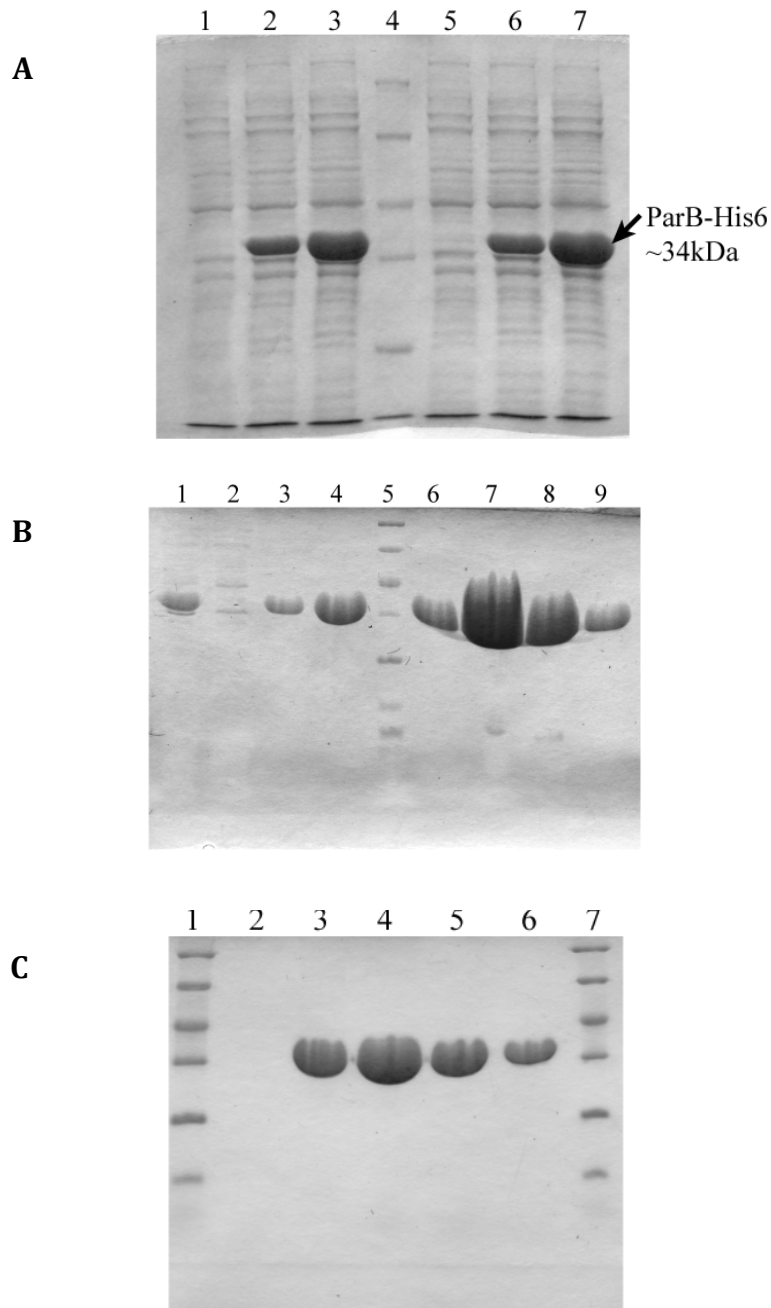


Figura 17. Purificação de ParB-His6 **A)** Expressão de ParB-His6: *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com o vetor pAPU4 (pET28a-*parB*) foi cultivada em meio LB a 37°C até que atingisse a D.O._{600nm} ~ 0,5 (canaletas 1 e 5 mostram extratos de dois transformantes, selecionados ao acaso, nestas condições de cultivo); IPTG foi adicionado para 1 mM final e células foram induzidas por um período de 3h a 30°C, onde alíquotas foram retiradas para averiguação nos tempos 1h e 3h, canaletas 2 ou 6 e 3 ou 7, respectivamente. **B)** Uma das linhagens acima foi cultivada em 1 L de LB, induzida por período de 3h a 30°C e submetida à lise e purificação em coluna de Ni²⁺-chelating; canaletas: 1, lisado, 2, flowthrough, 3, wash 20 mM imidazol, 4, 40 mM, 6, 80 mM e 7-9, pool wash 200 mM imidazol. **C)** Frações da purificação usando-se Heparina; canaletas: 2, flowthrough, 3-6, eluato/pico em força inônica total de aproximadamente 600 mM.

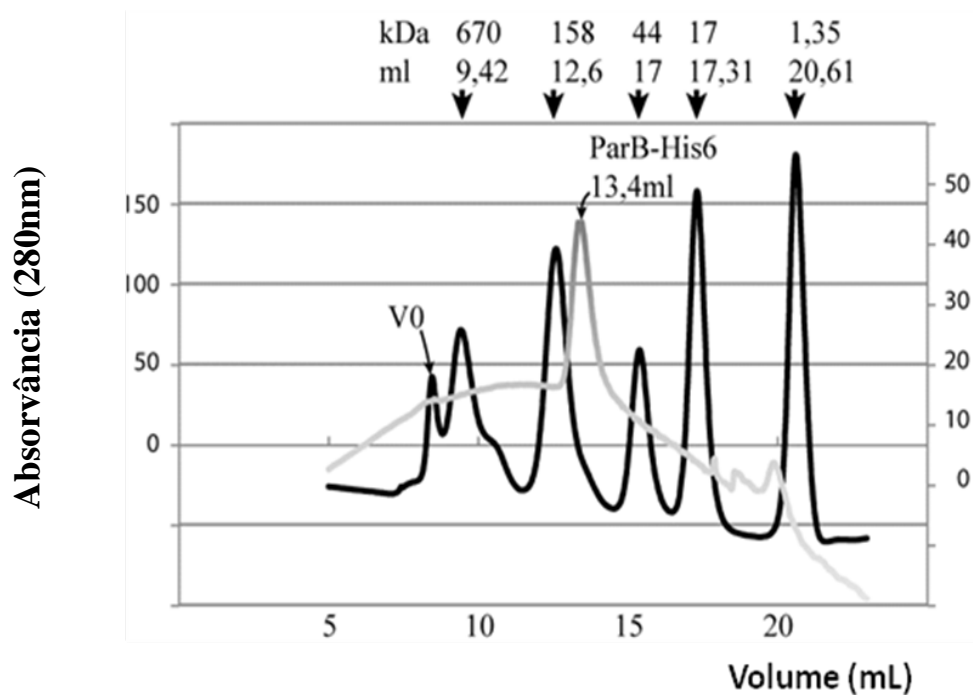


Figura 18. Cromatografia de exclusão molecular de ParB-His6 purificada. A proteína foi carregada em coluna Superdex200 e a retenção do volume foi comparada com o modelo de eluição de padrões de peso molecular Tiroglobulina (670 kDa), g-globulina (158 kDa), ovoalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa), e vitamina B12 (1,35 kDa). Os volumes dos padrões estão indicados abaixo de cromatograma; VO, volume residual. O eixo vertical refere-se a unidades de absorvância dos padrões (à esquerda) e de ParB-His6 (à direita).

documentado para Spo0J-His6 (Murray et al., 2006), portanto, ParB-His6 provavelmente existe em dímero em solução (massa molecular teórica para o monômeros de ParB-His6 é de aproximadamente 34 kDa).

Em seguida, as propriedades de ligação ao DNA de ParB-His6 foram avaliadas através de ensaios de shift realizados em gel de agarose, como reportado previamente para Spo0J-His6 (Murray et al., 2006). Nestes estudos pode-se mostrar três características de proteína tipo ParB em um único experimento: 1) ligação preferencial a sequências de DNA contendo *parS*, 2) ligação inespecífica ao DNA (baseado no conhecimento que proteínas que ligam especificamente ao DNA mantêm alguma habilidade de se ligar inespecificamente ao DNA) e 3) DNA-coating ou spreading lateral (Figura 19). Nesse experimento, diferentes concentrações da proteína purificada foram misturadas com o conjunto de dois fragmentos de DNA que foram produzidos por digestões enzimáticas de Spo0J-His6 clonada no vetor de expressão pSG4650. O conjunto de fragmento foi: 1) pSG4650/*NdeI/XhoI/NcoI*, gerando três fragmentos mostrados na canaleta 1 (pET21d é o vetor vazio enquanto que os outros dois fragmentos menores correspondem aos fragmentos do gene *spo0J* cortados com *XhoI* e *NcoI* (ver material e métodos). O gene *spo0J* possui um sítio *parS* (TGTTCCACGTGAAACA; posição 654-669) e após digestão foram produzidos os fragmentos *NdeI-parS-XhoI*, contendo 473 pb e um fragmento menor, *NcoI-NdeI*, sem a região *parS*. Após a mistura entre DNA e proteína foi observado que os fragmentos que possuem *parS* foram aqueles que retardaram primeiro em gel de agarose, apesar de ser o fragmento maior. Este resultado mostra a preferência de ParB pelo seu elemento *cis* e, apesar do fato dos fragmentos que não possuem nenhuma sequência relacionada a *parS* também terem sido retardados, estes resultados mostram que DNA contendo *parS* é ligado primeiramente.

A preferência de ligação ao DNA que contém *parS* exibida por esta proteína se torna mais evidente quando foi quantificada a porcentagem de DNA livre (medido por fluorescência) nas canaletas 4-7 (Figuras 19B e 19C). Finalmente, o retardamento de fragmentos maiores de DNA em gel de agarose, como ilustrado na Figura 19, é consistente com o fato de que ParB pode realmente estar engajado na ordenação de complexos DNA-proteína/proteína-proteína, o que é condizente com a idéia de que assim como Spo0J, ParB realiza spreading lateral.

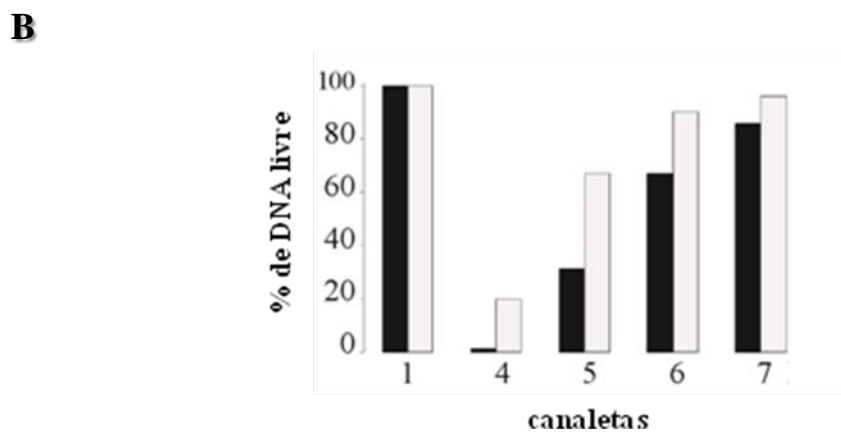
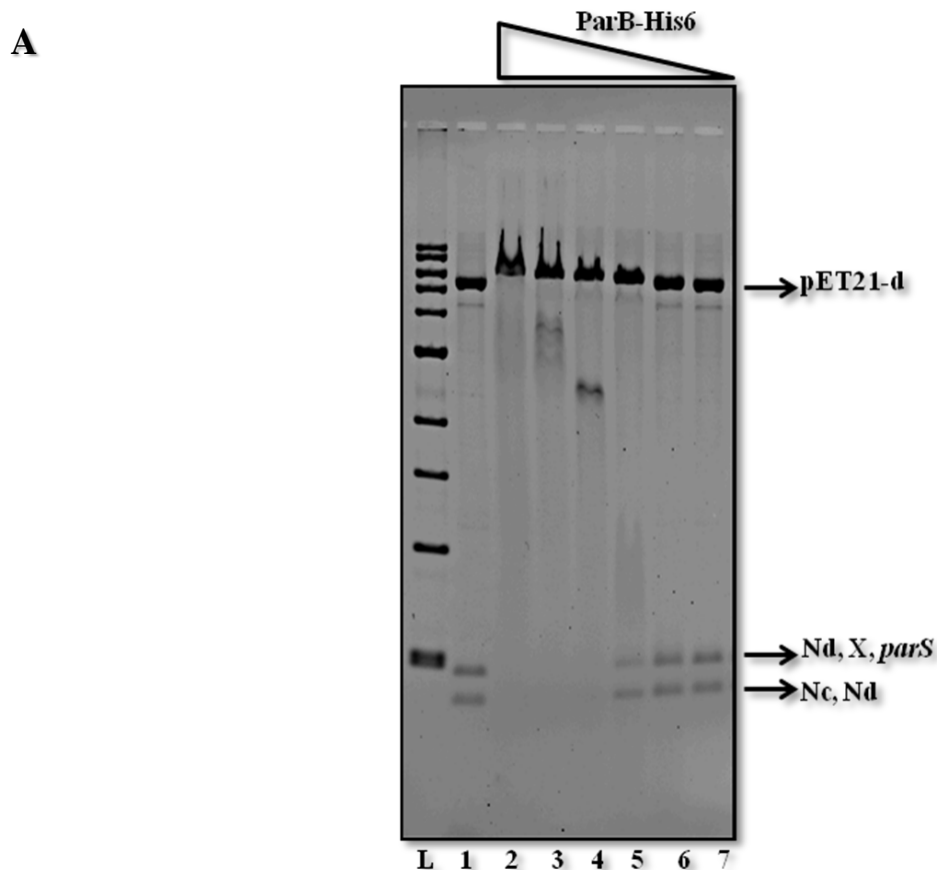


Figura 19. Shift de ParB em gel de agarose. Propriedades de ligação ao DNA de ParB-His6 foi verificada em ensaios de retardamento em gel seguidos de DNA-coating utilizando DNA contendo ou não *parS* como substrato. **A)** Após a ligação, os complexos DNA-proteína foram separados em gel de agarose 1%-TBE 1X a 5V/cm. L, ladder 1 kb (NEB), Nc, sítio de restrição *NcoI*, X, *XhoI*, Nd, *NdeI*. Concentração inicial de ParB-His6 foi 6,4 mM. **B)** porcentagem de substrato livre de DNA (DNA não ligado) detectados nas canaletas 4-7 do gel. Barras pretas correspondem ao fragmento que contém *parS* e as barras cinzas ao fragmento sem *parS*.

ParB interage com a região de origem do cromossomo de *Xac in vivo*

A sequência denominada *parS* é uma região conservada reportada na maioria das bactérias que utilizam o sistema de partição cromossômica tipo ParAB/*parS* (Gerdes et al., 2010; Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012). Como Livny et al. (2007) identificaram pelo menos uma região *parS* em *Xac* e, em adição aos dados previamente demonstrados por ensaios de retardamento em gel (Figura 19), sabe-se que a proteína ParB de *Xac* possui a habilidade de se ligar a moléculas de DNA com preferência a regiões contendo *parS* (sendo capaz também de realizar spreading lateral) *in vitro*. A fim de confirmar a ligação ParB-DNA *in vivo* e obter uma maior resolução dos sítios *parS* que podem estar distribuídos no genoma de *Xac*, foi realizado o experimento de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) seguido por sequenciamento em larga escala (ChIP-Seq). Para tal, o plasmídeo pCW512-*parB* (que expressa a versão ParB-TAP de *Xac*) foi eletroporado em *Xac* WT obtendo-se a linhagem *Xac* pCW512-*parB*, a qual foi utilizada neste experimento. Assim, ao atingirem D.O. desejada, a linhagem *Xac* pCW512-*parB* foi submetida à crosslink, lise celular e sonicação para a fragmentação das moléculas de DNA. Deste modo, após ligação dos complexos DNA-proteína (cromatina) *in vivo*, os complexos de interesse (ParB-TAP/DNA) foram imunoprecipitados utilizando anticorpo IgG. Seguidos de purificação, os fragmentos de DNA foram submetidos a sequenciamento para o mapeamento das regiões alvos de ligação *in vivo* de ParB-TAP no cromossomo de *Xac*. A Figura 20 mostra a região dos picos relevantes onde ParB-TAP pode ser ligado no cromossomo. Os valores plotados neste gráfico referem-se as maiores quantidades de fragmentos de DNA sequenciados (reads) com a respectiva posição genômica. Sequências *parS* altamente conservadas foram localizadas principalmente perto de regiões de origem do cromossomo (20% do cromossomo ao redor de *oriC*). Em acordo com Livny et al. (2007), nota-se claramente na Figura 20 que ParB-TAP é capaz de se ligar ao predito sítio *parS* (coordenada genômica c2753...2768). Os sítios de ligação de ParB foram significativamente enriquecidos na região de origem de replicação, próximo aos genes *dnaA* e *dnaN* (coordenada genômica aproximada c1600 em *Xac*) e puderam ser identificados até aproximadamente a posição 15 kb (15%) do cromossomo. O maior pico foi encontrado ao redor do gene *recF* (coordenada genômica c3799...4905), o qual está envolvido na replicação e/ou reparo de DNA de algumas bactérias (Chow & Courcelle, 2006). O fato da região cromossomal que se

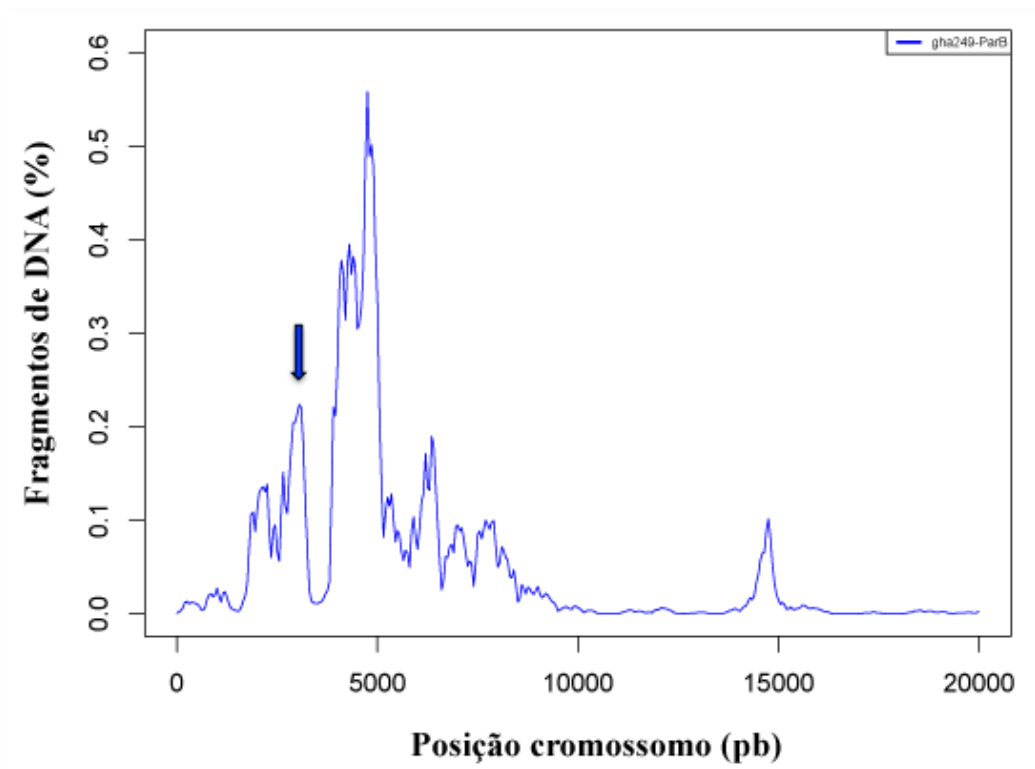


Figura 20. Sítios de ligação de ParB ao DNA de *Xac* *in vivo*. A linhagem *Xac* pCW512-parB foi cultivada em meio LB até alcançar a fase exponencial, proteínas e DNA foram submetidos a crosslink e imunoprecipitados com anticorpo IgG. Os fragmentos de DNA separados através da imunoprecipitação (reads) está plotado versus a posição no cromossomo de *Xac*. Os dados estão representados em escala linear do genoma de *Xac* WT. A flecha indica a posição do locus *parS* predito detectado por Linvy et al. (2007).

localiza ao redor do sítio *parS*, encontrada no imunoprecipitado, ter sido estendida mais do que o esperado para uma sequência de reconhecimento de apenas 15 pb indica o efeito de spreading lateral ou multimerização de ParB ao longo do DNA. Spreading lateral foi descrito para membros da família ParB de plasmídeos (Lynch & Wang, 1995; Jagura-Burdzy et al., 1999, Rodionov et al., 1999) e também para Spo0J em três sítios de ligação em *B. subtilis* (Murray et al., 2006). Em *B. subtilis*, Spo0J é capaz de se ligar a um total de 10 sítios *parS* e se espalhar por uma região de vários kilobases (Breier & Grosman, 2007). O sítio de nucleação *parS* é requerido para que Spo0J realize o spreading, mecanismo requerido para a função apropriada de Spo0J, pois a alta concentração local da proteína permite uma conformação específica ao longo do DNA. Normalmente, a formação de um grande complexo nucleoproteico causado pela interação de ParB com sequências *parS* pode influenciar na topologia do DNA e interferir no controle da expressão gênica. Apesar do spreading lateral não alterar a expressão de genes que estão ao redor da região de origem de *B. subtilis* (Breier & Grosman, 2007), o mesmo não ocorre com *P. aeruginosa*. Neste organismo, o spreading lateral pode causar o silenciamento de genes como *dnaA*, por exemplo, como mecanismo de forte regulação de início de replicação, evitando deste modo, o início de um novo evento durante uma mesma replicação (Bartosick et al., 2009).

Por fim, não foi detectada nenhuma ligação de ParB-TAP nos DNAs plasmidiais de Xac, pXAC33 e pXAC64. Assim, os dados obtidos neste experimento suportam as informações adquiridas nos experimentos de time-lapse, em que ParB-GFP é ligado nas regiões de origem do cromossomo e guiados até o polo oposto da célula para uma segregação cromossômica adequada (Figura 6) e, corrobora também com os dados dos ensaios de retardamento em gel, em que ParB-His6 provavelmente realizou spreading lateral (Figura 19) *in vitro*.

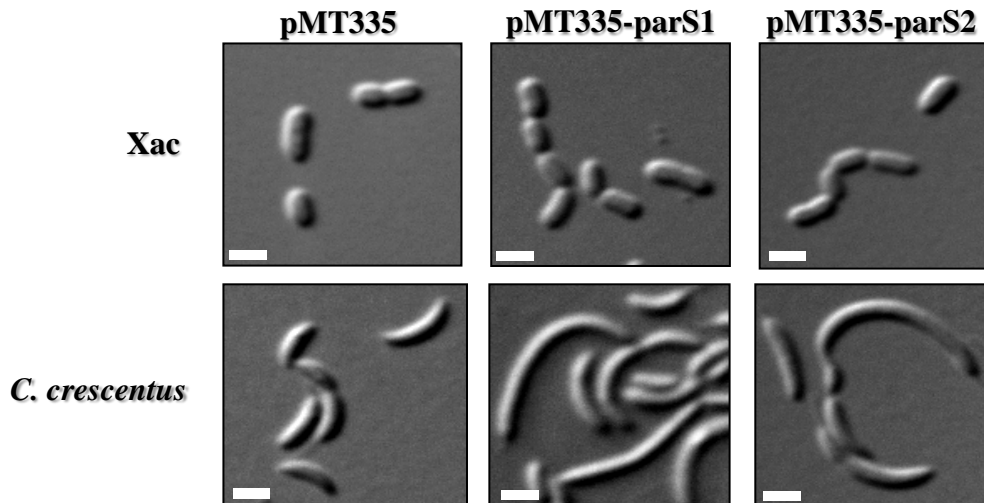
Cópias extras de *parS* prejudicam a divisão celular em Xac

Por ser um mecanismo coordenado, a quantidade de regiões de ligação de ParB ao DNA possui um papel crítico durante a segregação cromossômica (Toro et al., 2008, Passot et al., 2012). Com o objetivo de continuar a caracterização do mecanismo de segregação em Xac, foi questionado se a presença de cópias extras de *parS* na bactéria poderia interferir neste processo. Para isso, duas sequências

sintéticas, baseadas nos picos da região de ligação de ParB ao DNA obtidos nos ensaios de ChIP-Seq (Figura 20) foram inseridas em Xac. A primeira delas, que foi denominada de *parS1*, encontra-se no primeiro pico detectado (coordenada genética c2669...2800) e contém a sequência *parS* predita por Livny et al. (2007). A segunda sequência, *parS2*, é referente ao segundo pico (o maior deles) detectado (coordenada genética c4770...4920). Ambas as sequências (sintetizadas pela empresa FASTERIS) foram inseridas em vetor de alto número de cópias (pMT335) a fim de se obter várias regiões *parS* repetidas em Xac. Assim, após transformação dos plasmídeos pMT335-*parS1* e pMT335-*parS2* na linhagem de Xac selvagem, duas novas linhagens foram geradas: Xac pMT335-*parS1* e Xac pMT335-*parS2*. Através da análise morfológica destas duas linhagens por microscopia de contraste de interferência diferencial, foi possível observar uma grande semelhança com o fenótipo encontrado na linhagem Xac *parB::pAPU2*, a qual expressa somente formas truncadas de ParB. Ambas as linhagens Xac pMT335-*parS1* e Xac pMT335-*parS2* também possuem um retardamento no tempo de duplicação celular (dados não mostrados) e a tendência em formar células em cadeias (Figura 21A).

Sabe-se que o sistema ParAB/*parS* ativo é essencial em células de *C. crescentus* (Mohl et al., 2001). A coordenação do movimento de *parS* em direção ao pólo oposto da célula garante uma fiel replicação e segregação do cromossomo durante o ciclo celular neste microrganismo; portanto, a quantidade de regiões *parS* possui papel vital durante o ciclo celular (Toro et al., 2008). Deste modo, lembrando que o mecanismo de segregação cromossômica de Xac assemelha-se ao de *C. crescentus*, principalmente pelo fato de ambos apresentarem assimetria nesse processo, foi utilizado como controle a região *parS* de *C. crescentus* (denominada de *parSCc* neste trabalho) em Xac e as duas regiões *parS* de Xac (*parS1* e *parS2*) em *C. crescentus*. A adição de sequências *parS* extras em *C. crescentus* acarreta na inviabilidade celular (Toro et al., 2008), porém, interessantemente, não comprometem a viabilidade celular em Xac (Figura 21B). Quando inseridas em Xac, regiões *parSCc* são responsáveis pelo mesmo fenótipo detectado quando as sequências *parS1* e *parS2* estão presentes em cópias extras, sugerindo que *parSCc* também interfere nos processos de segregação cromossômica/divisão celular em Xac. No entanto, quando as sequências *parS1* e *parS2* são inseridas em *C. crescentus*, as células continuam viáveis, porém com graves problemas de segregação cromossômica, detectados pelo fenótipo das células alongadas (Figura 21A).

A



B

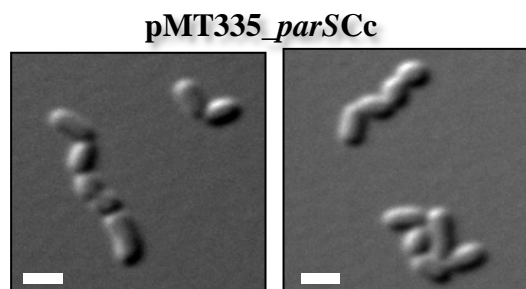


Figura 21. Morfologia das linhagens de *Xac* contendo cópias cromossomais extras de regiões de ligação de ParB. A análise foi feita em células de *Xac* e *C. crescentus* contendo os plasmídeos pMT335, pMT335-parS1, pMT335-parS2 e pMT335-parSCc. **A)** Linhagens de *Xac* e *C. crescentus* eletroporadas com os plasmídeos pMT335, pMT335-parS1, pMT335-parS2, **B)** *Xac* eletroporada com o plasmídeo pMT335-parSCc. As células foram cultivadas em meio LB ou PYI a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3, imobilizadas em lâminas de agarose 1% e visualizadas em contraste de interferência diferencial (DIC). Barras de escala correspondem a 4 µm.

A presença de regiões cromossomais extras contendo sítios de ligação a ParB não acarretam na morte celular de Xac, porém, o fenótipo de formação de células em cadeias sugere algum defeito na divisão celular. Por serem indistinguíveis das sequências cromossomais de Xac, a presença destas cópias que são diretamente ligadas por ParB *in vivo* (Figura 20), provavelmente geram uma competição intracelular com proteínas tipo ParB, o que pode atrapalhar o início da segregação cromossômica guiada por *parS*, e conseqüentemente, afetar a divisão celular.

Interações genéticas de ParB

Experimentos denominados de Tn-Seq podem avaliar o fitness de um microrganismo através da mutagenese por saturação de inserções de transposon no genoma (Tn) seguido de sequenciamento em larga escala (Tn-Seq) (van Opijnen et al., 2009; Fels et al., 2013). Essa técnica, além de determinar o fitness conferido por um único gene, também pode mapear interações genéticas no microrganismo em estudo e fornecer o perfil de genes que são essenciais ou não em uma determinada situação.

Assim, a fim de avaliar quantitativamente as possíveis interações genéticas envolvendo *parB* de Xac, foi determinado a frequência relativa de inserção de transposon nas linhagens Xac *parB*::pAPU2 (a qual contém a interrupção gênica de *parB*) em comparação com a linhagem Xac *parB*::pAPU1 através de mutagênese utilizando o transposon Tn Mar2XT7. A linhagem Xac *parB*::pAPU1 foi escolhida como modelo para a comparação pois, além de não ter mostrado nenhuma alteração morfológica e/ou fisiológica (das quais foram avaliadas), apresenta resistência à canamicina (facilitando a seleção após conjugação com a linhagem de *E. coli*), e também contém a inserção de um plasmídeo em seu genoma de forma similar a linhagem Xac *parB*::pAPU2, tornando a comparação mais apropriada. Após o sequenciamento, pode-se notar que as inserções de transposon foram representadas cerca de 85 vezes mais ao longo da sequência codificadora *parA* nas células de Xac *parB*::pAPU2 (Gráfico 1). Outras inserções frequentes encontradas na mesma linhagem foram super representadas ao longo das sequências codificadoras *minD* e *gumC* (Gráfico 1). A provável desativação de *parA* por transposon na linhagem

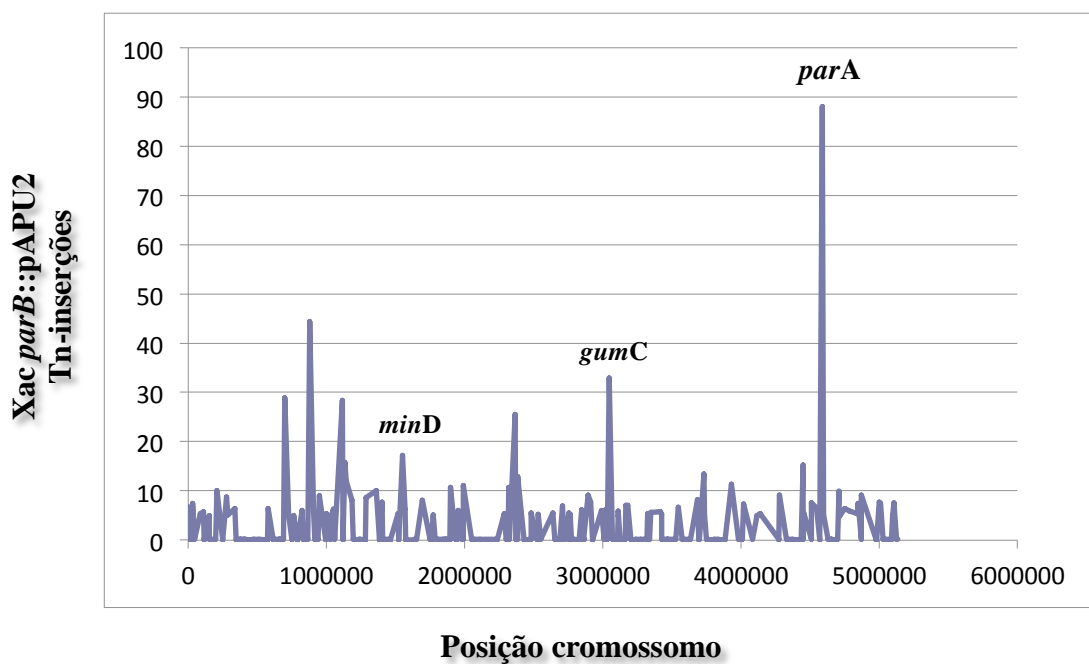


Gráfico 1. Mapeamento de inserções de transposon no genoma de *Xac* (Tn-Seq). O transposon Tn Mar2XT7 foi inserido em *Xac* através de conjugação bacteriana. A figura mostra a frequência relativa da inserção de transposon nas linhagens mutagenizadas *Xac parB::pAPU1* e *Xac parB::pAPU2*.

mutante contendo a disrupção de *parB* já era esperada, uma vez que a proteína ParB provavelmente está inativa ou possui atividade residual na linhagem mutante.

A possível inativação de *minD* na linhagem Xac *parB::pAPU2* corrobora com os dados encontrados por Silva et al. (2013) onde é descrito uma possível ligação entre os processos de segregação cromossômica e divisão celular em Xac. Normalmente o sistema Min atua na formação do divisomo em bactérias que possuem segregação cromossômica simétrica, como *B. subtilis* e *E. coli*, por exemplo (revisado por Lutkenhaus 2007). Quando o complexo MinCD mostra-se inativo, normalmente é observado o fenótipo de filamentação celular ou formação de mini células (Cha & Stewart, 1997). O fato do mutante Xac *parB::pAPU2* filamentar sugere, portanto, a ausência de fatores de seleção para localização de septo, o que pode justificar o aumento do fitness na linhagem Xac *parB::pAPU2* quando genes que compreendem esse sistema estão desativados.

Além dos defeitos na segregação cromossômica, a linhagem Xac *parB::pAPU2* perdeu a habilidade de causar os sintomas do cancro cítrico (Figura 10). Sabe-se que *gumC* faz parte do cluster responsável pela síntese de exopolissacarídeo (EPS), um importante fator durante o processo de infecção por Xac, cujas alterações em genes pertencentes a este cluster podem ser associadas com a diminuição da virulência da bactéria (Guo et al., 2010). A biossíntese de goma xantana em *X. vesicatoria* também é regulada pelo cluster *gum* que é formado por 12 genes (*gumB* ao *gumM*), sendo que *gumB* e *gumC* são necessários para a sua produção (Katzen et al., 1998; Vojnov et al., 1998). Apesar de Dunger et al. terem relatado (2007) a contribuição do gene *gumD* de Xac, através de sua deleção parcial, apenas para a sobrevivência epífita (e não para a patogenicidade) da bactéria, Kemp et al. (2004) haviam mostrado anteriormente a essencialidade de *gumD* na produção de EPS em *X. manihotis*. A importância de genes pertencentes a este mesmo cluster no processo de infecção por Xac também vem sendo revelada. Mutações realizadas em *gumB* resultam na não formação de biofilmes estruturados, na diminuição ou perda da produção de goma e comprometem a patogenicidade de Xac em três diferentes métodos de inóculo testados (Rigano et al., 2007; Vojnov et al., 1998).

Para futuras investigações que possam, por mais uma vez, relacionar o processo de segregação cromossômica em Xac com divisão celular e/ou patogenicidade, os três mutantes citados no experimento de Tn-Seq serão recuperados do pool de bactérias mutagenizadas para a melhor caracterização de cada um deles.

Disrupção em *parB* altera motilidade em Xac

Com o objetivo de avaliar se ParB possui alguma interferência na motilidade de Xac foi decidido testar a capacidade de movimentação da linhagem Xac *parB::pAPU2* em placas de Petri contendo baixa concentração de ágar. Para isso, foram analisados dois tipos de motilidade que são regulados pelo sistema de sinalização celular mediado pelo DSF (diffusible signal factor).

Após crescimento até atingirem a fase estacionária, as duas linhagens foram inoculadas nos meios NYGB (0,25% ágar) e PYM (0,5% ágar) para avaliação dos movimentos swimming e sliding, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 22, a linhagem Xac *parB::pAPU2* mostrou redução em ambas as motilidades testadas e nenhum possível mutante supressor foi detectado.

Swimming é um poderoso movimento que ocorre devido a rotação do flagelo e o sistema de transdução de sinal de quimiotaxia (Henrichen, 1974). Em *P. aeruginosa*, a ausência ou mutações em *parB* prejudicam a atividade de swimming da bactéria levando a interpretação de uma possível relação entre proteínas ParB sem atividade de spreading no DNA e a habilidade de movimentação (Bartosik et al., 2009; Kusiak et al., 2011). Os genes requeridos para a biogênese flagelar em Xac estão distantes da região cromossômica onde pAPU2 foi integrado e onde os sítios *parS* estão localizados. Pela avaliação do contexto genômico da linhagem Xac *parB::pAPU2*, não há indícios do comprometimento da formação do flagelo e seu ativo movimento de rotação devido a possíveis mutações polares após integração do plasmídeo. Portanto, para o desvendamento da redução de swimming e provável relação com ParB, futuramente serão avaliados a presença do flagelo na linhagem mutante Xac *parB::pAPU2*, a integridade dos genes *fliC* e *flgE* que estão envolvidos em sua formação e são requeridos para swimming e os genes *rpfC* e *rpfF* do sistema quorum-sensing (Malamud et al., 2011).

De acordo com os dados obtido através de Tn-Seq, a linhagem Xac *parB::pAPU2* tem a propensão de inativar o gene *gumC* a fim de melhorar seu fitness bacteriano. Sabe-se que *gumC* é parte do cluster *gum* composto por 12 genes responsáveis pela biossíntese de goma xantana. Recentemente foi demonstrado que os níveis da proteína GumC, junto com GumB, modulam o tamanho da cadeia do exopolissacarídeo formado de maneira que algumas alterações podem alterar a

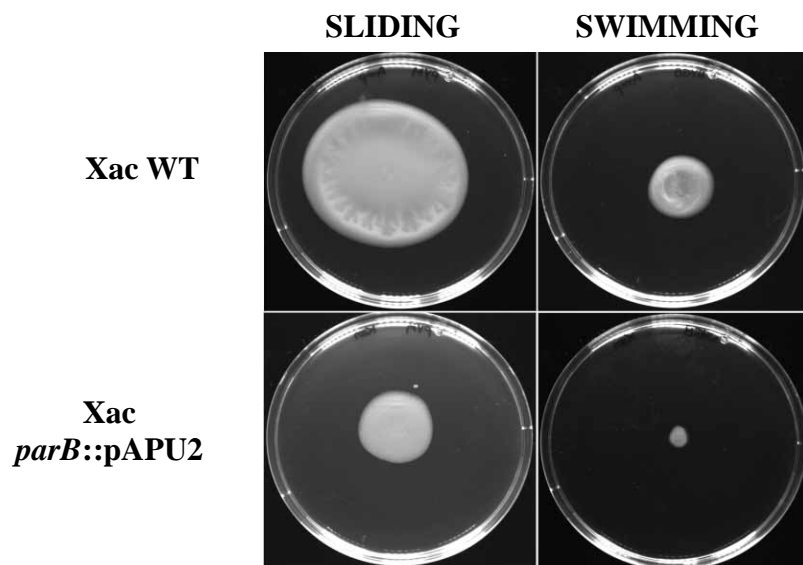


Figura 22. Efeitos da mutação de *parB* na motilidade de Xac. A) Sliding B) Swimming. As linhagens Xac WT e Xac *parB*::pAPU2 foram crescidas até a fase estacionária, inoculadas em placas contendo baixa concentração de ágar e crescidas a 30° durante 72h.

viscosidade do polímero (Galván et al., 2013) que, por sua vez, pode atuar como um agente surfactante facilitando o sliding. Por definição, sliding é uma forma passiva de movimento através do espalhamento em uma superfície sem requerer um motor ativo. Porém, tal movimentação é dependente de agentes surfactantes para reduzir a tensão da superfície e ajudar o movimento (Henrichen, 1972).

Sabe-se que a síntese e percepção por DSF requer proteínas codificadas pelo cluster *rpf* (regulation of pathogenicity factors). RpfF direciona a síntese de DSF enquanto RpfC está envolvida com a percepção (Barber et al., 1997). Além disso, mutações em genes pertencentes a este cluster reduzem a virulência de *X. campestris* (Barber et al., 1997). Recentemente foi comprovado em *Xac* que EPS é requerido para sliding, e tanto sliding quando swimming são regulados por *rpfl* do sistema DSF (Malamud et al., 2011). Genes relacionados com a produção do EPS xantana ainda não foram averiguados na linhagem mutante *Xac parB::pAPU2*, porém, há uma grande chance de genes pertencentes ao cluster *gum* estarem desativados.

Em suma, a disrupção de *parB* acarretou na inabilidade de *Xac parB::pAPU2* em desenvolver os sintomas do cancro cítrico, diminuição na taxa de crescimento, comprometimento da segregação cromossômica/divisão celular e redução na motilidade.

Segregação cromossômica e divisão celular são mecanismos ligados em *Xac*

Segregação cromossômica e divisão celular são mecanismos relacionados em muitas bactérias (Lau et al., 2003; Lemon & Grossman, 2001). Tal interação vem sendo mostrada através do envolvimento entre proteínas pertencentes a cada um deles, como por exemplo FtsZ com ParB e MipZ com ParB (Thanbichler & Shapiro, 2006; Donovan et al., 2010). Na busca de tratamentos contra o cancro cítrico foi detectado que além de interferirem na formação do septo, ésteres de galatos de alquila também podem causar a deslocalização de ParB-GFP em *Xac*, sugerindo a possibilidade de fatores ou sistemas comuns para ambos os processos (Silva et al., 2013). Dados obtidos neste presente trabalho (experimentos de Tn-Seq) também sugeriram a interação entre esses dois processos em *Xac* (Gráfico 1). Assim, a fim de melhor avaliar da relação entre estes dois mecanismos essenciais, foi decido observar a localização de ZapA (Z associated protein) de *Xac* na linhagem *Xac parB::pAPU3*.

ZapA é uma proteína conservada que age como um regulador da proteína de divisão celular FtsZ e atua diretamente no sítio de formação do anel Z. Apesar de não ser essencial em *B. subtilis*, ZapA interage diretamente com FtsZ contribuindo para a estabilização dos polímeros formados através de ligações cruzadas (Gueiros-Filho & Losick, 2002). Deste modo, o posicionamento do centrômero mostrado pela localização de ParB juntamente com a marcação do septo através da proteína ZapA são considerados ótimos indicadores que podem clarear o envolvimento entre segregação cromossômica e divisão celular em *Xac*. Para isso, ZapA de *Xac* foi inserida no vetor pMT335-mCherry para a expressão da fusão ZapA-mCherry e eletroporada na linhagem de *Xac* que expressa ParB-GFP (*Xac parB::pAPU3*). Como visto na Figura 23, a formação do anel Z (representado por ZapA-mCherry) ocorre em células onde o foci de ParB-GFP encontra-se nos pólos celulares, ou seja, no final de um evento de replicação e segregação cromossômica; o que sugere a coordenação entre ambos os processos. Em *C. crescentus* foi demonstrado que ParB opera na divisão celular através do sequestro de MipZ (inibidor de FtsZ) para áreas longe do centro celular, local onde o divisomo é montado (Thanbichler & Shapiro, 2006). Em busca de possíveis interactantes de ParB foi realizado experimento de duplo-híbrido porém, tal experimento não foi bem sucedido e nenhuma interação confirmativa foi detectada, nem mesmo com a própria proteína ParB (dados não mostrados). Curiosamente, em ensaios de duplo-híbrido utilizando como isca a proteína ZapA também não foram detectadas nenhuma interação com FtsZ apesar de, desta vez, ter sido revelada a interação com seu parceiro ZapA (Martins, P. M. M., dados não publicados). Apesar de estar anotado no genoma de *Xac* fatores de inibição de formação do anel Z, como por exemplo *minCDE* e *sula*, ainda não há estudos comprovando suas respectivas atividades/funções. No entanto, a presença de tais ORFs homólogas responsáveis pela prevenção da polimerização de FtsZ somados aos dados descritos por Silva et al. (2013) e, juntamente com os resultados de experimentos de Tn-Seq e localização de ParB-GFP/ZapA-mCherry relatados neste trabalho, resumem fortes indícios da relação entre segregação cromossômica e divisão celular em *Xac*.

ParA e ParC são expressas em Xac

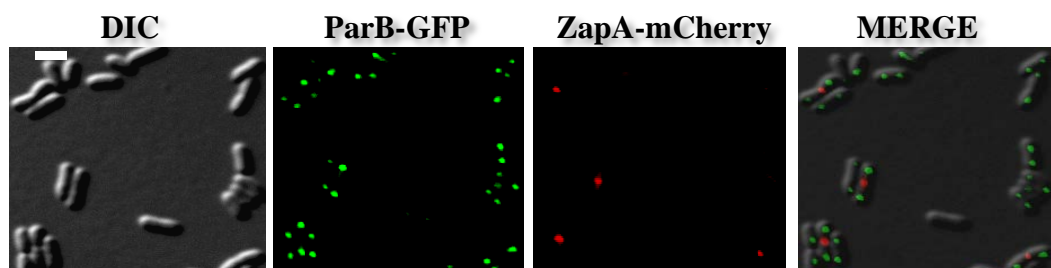


Figura 23. Localização de ParB-GFP e ZapA-mCherry em Xac. O padrão de localização de ParB-GFP e ZapA-mCherry foi analisado na linhagem Xac *parB::pAPU3* contendo o plasmídeo pMT335-mCherry-zapA. Células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3, imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1% e visualizadas utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e de fluorescência (GFP e mCherry). Barra de escala correspondem a 4 µm.

Sabendo que ParB é expressa em *Xac* e possui um papel ativo no processo de segregação cromossômica, foi decidido avaliar a atividade de outras duas ORFs tipo *parA* em seu cromossomo: XAC1907 e XAC3906 (da Silva et al., 2002). Como a ORF XAC3906 faz parte do operon *parAB* (XAC3905 e XAC3906) cujo promotor *pparAB* mostrou ser funcional em *Xac* (Figura 4B), foi decidido utilizar um sistema de expressão plasmidial para verificar se *parA* (XAC3906) é expresso na bactéria através da cauda TAP (ParA-TAP). Para tal, *parA* foi inserido no plasmídeo pCW512 gerando a construção pCW512-*parA* que expressa a fusão ParA-TAP. A ORF XAC1907, denominada de *parC* neste trabalho (partitioning chemotaxis), também foi inserida em pCW512 gerando pCW512-*parC*. Como controle do experimento foi utilizado o plasmídeo pCW512-*parB*. O vetor replicativo pCW512 é derivado do pMT335 e possui promotor indutível por vanilato (Thanbichler et al., 2007). Apesar de ter sido construído para ser utilizado em *C. crescentus*, este é um sistema que funciona em *Xac*, embora ocorra vazamento do promotor de vanilato nesta bactéria. Deste modo, células de *Xac* WT foram eletroporadas com pCW512-*parA*, pCW512-*parB* e pCW512-*parC* gerando as linhagens *Xac* pCW512-*parA*, *Xac* pCW512-*parB* e *Xac* pCW512-*parC*, respectivamente. Após crescimento em meio LB a 30°C até atingirem a fase midi-log, as culturas foram crescidas por mais 3-4h na ausência ou presença de 5 mM do indutor, momento em que foram submetidas à detecção imunológica através de TAP em ensaios de Western blotting. Assim, como observado na figura 24, os sinais de 49 kDa, 54 kDa e 48 kDa são consistentes com os tamanhos esperados para ParA-TAP, ParB-TAP e ParC-TAP, respectivamente. Nota-se o vazamento do promotor em *Xac* nas amostras que não foram induzidas e a alta expressão nas amostras induzidas com vanilato, concluindo que tanto *parA* quanto *parC* podem ser expressos na bactéria.

No contexto genômico de *Xac*, apesar de *parC* estar anotado como *parA*, o gene encontra-se no meio do cluster *che* que codifica para proteínas relacionadas a quimiotaxia (da Silva et al., 2002). Outras γ -proteobactérias como *Pseudomonas*, *Shewanella* e também membros da família *Vibrio* possuem homólogos a *parC*. Diferentemente de genes *parA* que estão adjacentes a *parB* e possuem envolvimento com a partição cromossômica, há um grande grupo de proteínas tipo ParA que são codificadas dentro de operon responsável pela quimiotaxia (Ringgaard et al., 2011). Em *V. cholerae* foi mostrado que ParC modula a distribuição subcelular de proteínas

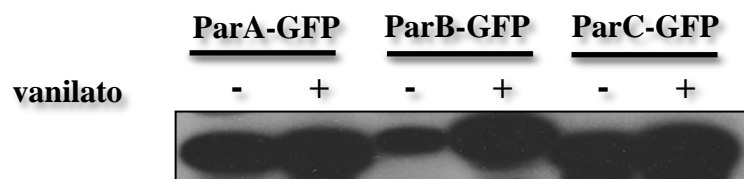


Figura 24. Expressão de ParA, ParB e ParC em Xac. Western blotting foi realizado para detectar a expressão de ParA-TAP (49 kDa), ParB-TAP (54 kDa) e ParC-TAP (48 kDa) em extratos proteicos das linhagens Xac pCW512-parA, Xac pCW512-parB e Xac pCW512-parC, respectivamente. O indutor (vanilato) foi (+) ou não (-) adicionado às culturas celulares, como descrito no texto.

de quimiotaxia e facilita a transmissão de CheY para o flagelo (Ringgaard et al., 2011) para mudança de rotação do motor flagelar (Sourjik & Armitage, 2010). Células de *V. cholerae* que possuem *parC* nocauteado geralmente mostram a deslocalização de proteínas de quimiotaxia, reduzem em 10% a habilidade de “swarming” e durante o “swimming” invertem com menos frequência a direção do movimento (Ringgaard et al., 2011). Tentativas de localização celular de ParC-GFP, através da eletroporação do plasmídeo pCW510-*parC* que expressa tal fusão (linhagem Xac pCW510-*parC*) não foram conclusivas para a determinação do padrão de localização desta proteína em Xac. Como pode ser observado na Figura 25, ParC-GFP mostrou localização difusa na linhagem Xac pCW510-*parC* juntamente com fenótipo de formação de cadeias. Assim, para clarear o papel de ParC em Xac, futuras tentativas de localização da proteína utilizando a fusão com diferentes proteínas fluorescentes juntamente com ensaios de swimming serão realizadas.

Em suma, o fato de *parA* ser expresso em Xac corrobora com os prévios resultados que sugerem o envolvimento de *parB* na segregação cromossômica e reforça, portanto, os indícios da utilização do sistema de particionamento cromossômico tipo ParAB/*parS* durante o ciclo celular de Xac.

Localização de ParA em Xac

Vários estudos mostraram a segregação cromossômica bacteriana mediada por ParA utilizando o modelo descrito para *B. subtilis* e *C. crescentus* (Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012). Recentemente também foi demonstrado em *V. cholerae* que o complexo ParB/*parS* segue a retração de ParA devido a sua despolimerização, lembrando os sistemas plasmídias previamente descritos (Ptacin et al., 2007; Shoefild et al., 2010). Foi visto que ParA purificada de *C. crescentus*, assim como em outros sistemas Par, é capaz de polimerizar *in vitro* na presença de ATP e se ligar facilmente ao DNA tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hui et al., 2010; Ptacin et al., 2010; Shoefild et al., 2010; Vecchiareli et al., 2010). Deste modo, com o propósito de caracterizar o papel de ParA de Xac foi construída uma linhagem capaz de expressar *parA* fusionado com *gfp* sob o controle do promotor de vanilato, pois a localização de proteínas *in vivo* é um método bastante eficaz para ajudar a desvendar funções

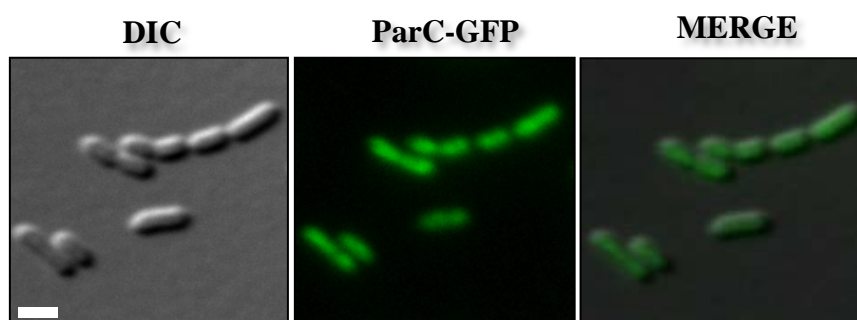


Figura 25. Microscopia de fluorescência utilizando a linhagem Xac pCW510-parC. A linhagem Xac pCW510-parC foi visualizada utilizando microscopia por contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência (GFP). As células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3 e imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1%. Barras de escala correspondem a 4 µm.

proteicas. Assim, o plasmídeo pCW510-parA, responsável pela expressão da fusão ParA-GFP, foi eletroporado em Xac dando origem a linhagem Xac pCW510-parA.

A localização subcelular de ParA-GFP na linhagem Xac pCW510-parA foi detectada ora como foci bipolar ora como uma união linear de ParA-GFP (Figura 26). Este padrão observado corrobora com os dados detalhados em outros microrganismos, sugerindo que ParA de Xac também pode ser polimerizada de um pólo celular ao outro durante a segregação cromossômica (Fogel & Waldor 2006; Ptacin et al., 2010). As células que possuem o foci linear de ParA provavelmente estão no momento do ciclo celular em que as proteínas estão ligadas ao DNA. Nesse período, proteínas ParA estão prontas para serem translocadas em direção ao novo pólo celular através de sua despolimerização, atividade esta que é mediada pela sequência *parS* e garante a migração de proteínas ParB que estão ligadas neste complexo.

Para a maior investigação do envolvimento de ParA de Xac durante a segregação cromossômica foi avaliado o efeito de versões mutagenizadas da proteína através de sua localização subcelular por microscopia de fluorescência com o objetivo de detectar possíveis alterações no seu padrão de localização. Assim, para anular interações bioquímicas específicas, três mutações sítio-dirigidas foram criadas em ParA de Xac: ParA_{K20Q}, ParA_{G12V} e ParA_{D40A}. De acordo com estudos realizados com proteínas tipo ParA, as três mutações pontuais abrangeram resíduos de aminoácidos conservados que são requeridos na via bioquímica da proteína, como por exemplo ligação a moléculas de ATP, dimerização e hidrólise de ATP, respectivamente (Leonard et al., 2005; Toro et al., 2008; Ptacin et al., 2010). As três formas mutagenizadas de ParA foram inseridas em pCW510 para a expressão fusionada com GFP e deste modo, os plasmídeos pCW510-ParA_{K20Q}, pCW510-ParA_{G12V} e pCW510-ParA_{D40A} foram eletroporados em Xac criando as linhagens merodiploides Xac ParA_{K20Q}, Xac ParA_{G12V} e Xac ParA_{D40A}.

A linhagem Xac ParA_{K20Q} provavelmente é deficiente na ligação com ATP. Em *C. crescentus*, a lisina 20 de ParA é um resíduo de aminoácido altamente conservado presente no motif de ligação a ATP, e mutações neste aminoácido impedem a completa segregação cromossômica, atrapalha a formação do anel Z e acarreta na formação de mini células (Toro et al., 2008). Mutação similar em *B. subtilis* (Soj K16Q) evita a oscilação de Soj e sua associação com o nucleóide, dados que são consistentes com o detalhado para *T. thermophilus*, em que Soj K20A também não é capaz de se ligar a nucleotídeos (Quisel et al., 1999; Leonard et al.,

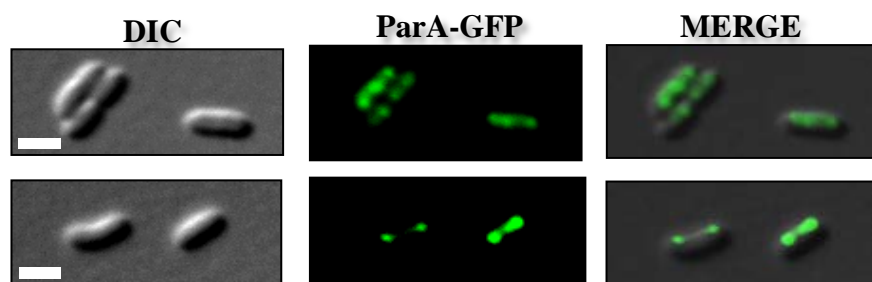


Figura 26. Localização de ParA-GFP em Xac. A linhagem Xac pCW510-parA foi visualizada utilizando microscopia por contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência (GFP). As células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3 e imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1%. Barras de escala correspondem a 4 µm.

2005). Seguindo a hierarquia das funções de ParA, o fato de ParA_{K20Q} não ser capaz de se ligar a ATP impede os processos subsequentes de dimerização da molécula e ligação a ParB e ao DNA, forçando ParA_{K20Q} a permanecer como monômeros dispersos na célula, representado pela localização difusa (Figura 27A). Este padrão observado, portanto, sugere a possível função de ligação a ATP de ParA de Xac durante a segregação cromossômica.

Na Figura 27B, a mutação ParA_{G12V} na linhagem Xac ParA_{G12V} também revelou um padrão de localização celular difuso. Através dessa observação acredita-se que esta linhagem, assim como proposto para *C. crescentus*, é bloqueada no processo de dimerização proteica (Ptacin et al., 2010). Também foi notificado em *T. thermophilus* que, mesmo na presença de ATP, a mutação equivalente (Soj G16V) é incapaz de se ligar ao DNA *in vitro* independentemente da concentração proteica, comprovando que a dimerização de proteínas tipo ParA possui um papel crítico na interação com moléculas de DNA (Leonard et al., 2005). Apesar de ParA_{G12V} ser capaz de ligar ATP, a proteína não possui a habilidade de formar homodímeros, provavelmente permanecendo distribuída na célula como monômeros ligados a ATP.

Na linhagem Xac ParA_{D40A}, ParA_{D40A} pode localizar como dois foci nas extremidades celulares (semelhante aos foci de ParB) ou vários foci distribuídos pela célula (Figura 27C), assim como mostrado para ParA D44A de *C. crescentus* (Ptacin et al., 2010). Foi relatado para *T. thermophilus* que Soj D44A é capaz de formar dímeros na presença de ATP e possui ligação eficiente ao DNA *in vitro* em diversas concentrações proteicas testadas (Leonard et al., 2005). A mutação equivalente em Xac provavelmente também evita a hidrólise de ATP ou troca de nucleotídeo, sugerindo, neste caso, que a proteína pode ser capaz de se ligar a ATP, formar homodímeros e se ligar ao DNA. Porém, por não ser capaz de hidrolisar moléculas ATP mediada por ParB, ParA_{D40A} talvez permaneçam dentro da célula em estado conformacional ligado a ATP.

Em suma, os padrões de ParA de Xac e suas versões mutagenizadas que foram visualizados até o momento são consistentes com as funções de proteínas tipo ParA, reforçando a idéia que Xac tem um sistema de particionamento tipo ParAB/parS ativo.

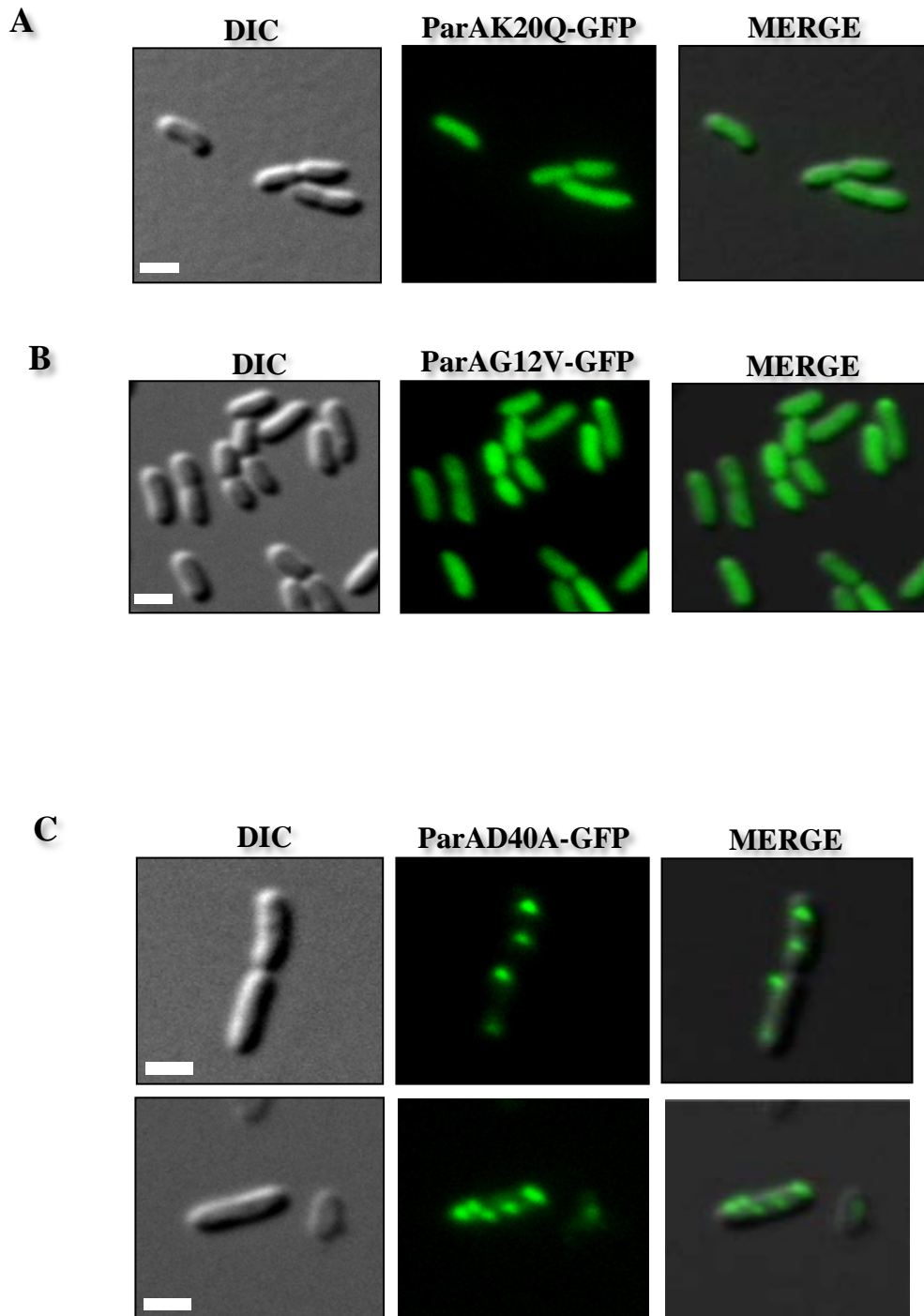


Figura 27. Localização subcelular de versões mutagenizadas de ParA-GFP em *Xac*. As linhagens de *Xac* foram visualizadas utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência (GFP). **A)** Localização de ParA_{K20Q} na linhagem *Xac* ParA_{K20Q} (ParAK20Q-GFP) **B)** Localização de ParA_{G12V} na linhagem *Xac* ParA_{G12V} (ParAG12V-GFP) **C)** Localização de ParA_{D40A} na linhagem *Xac* ParA_{D40A} (ParAD40A-GFP). As células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3 e imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1%. Barras de escala correspondem a 4 µm.

ParA interage com moléculas de DNA *in vivo*

Foi demonstrado em diversos sistemas cromossomais que ParA ligada a ATP pode interagir com ParB e também com DNA de maneira inespecífica. Estas interações estimulam a atividade ATPásica permitindo a liberação de ParA do nucleóide e fazendo com que a proteína retorne ao seu estado de monômero ou dímero se ligadas a ATP (Marston & Errington, 1999; Murray & Errington, 2008, Vecchiarelli et al., 2010). Assim, para a confirmação da ligação de ParA de *Xac* ao DNA foram realizados experimentos de ChIP-Seq utilizando as linhagens *Xac* pCW512-*parA* e *Xac* *parB*::pAPU2 pCW512-*parA* (*Xac* *parB*::pAPU2 eletrotransformada com o plasmídeo pCW512-*parA*).

Nesse experimento, após as células atingirem a fase midi-log, os complexos ParA-DNA das duas linhagens foram imunoprecipitados utilizando anticorpo IgG e submetidos a sequenciamento para o mapeamento das regiões de ligação *in vivo* de ParA-TAP no cromossomo de *Xac*. Os Gráficos 2A e 2B mostram as posições onde ParA pode ser ligado no cromossomo de *Xac*. Nota-se no Gráfico 2A vários picos por toda a extensão do genoma, comprovando que ParA pode ser ligar a diferentes regiões do DNA na linhagem *Xac* pCW512-*parA*. Diferentemente, no Gráfico 2B, referente a linhagem mutante contendo a disrupção em *parB*, mostrou alteração no perfil genômico de interação ParA-DNA. Em *Xac* *parB*::pAPU2 pCW512-*parA*, ParA-TAP não é capaz de se ligar exatamente nas mesmas regiões da linhagem selvagem. Provavelmente, devido a ausência de ParB na linhagem mutante, ParA é mais facilmente encontrada em seu estado dimérico ligada a ATP e interagindo aleatoriamente ao DNA. Na maioria dos cromossomos contendo genes que codificam para proteínas Par, como *B. subtilis*, *C. crescentus*, *S. coelicolor*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* e *C. glutamicum*, por exemplo, houve a confirmação da participação de proteínas Par durante o processo de segregação cromossômica (revisado em Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012). Apesar das proteínas ParA e ParB revelarem similaridades entre os organismos, elas também possuem particularidades em cada espécie, como a participação no processo de esporulação, regulação no início da replicação, motilidade e comunicação celular (Bartosick et al., 2009; Lee & Grosman, 2006; Malamud et al., 2011; Mohl et al., 2001). Linhagens de *P. aeruginosa* com mutação nula em *parB*, por exemplo, mostram mudanças na expressão gênica global, provavelmente devido a uma ação sem controle de ParA na ausência de ParB

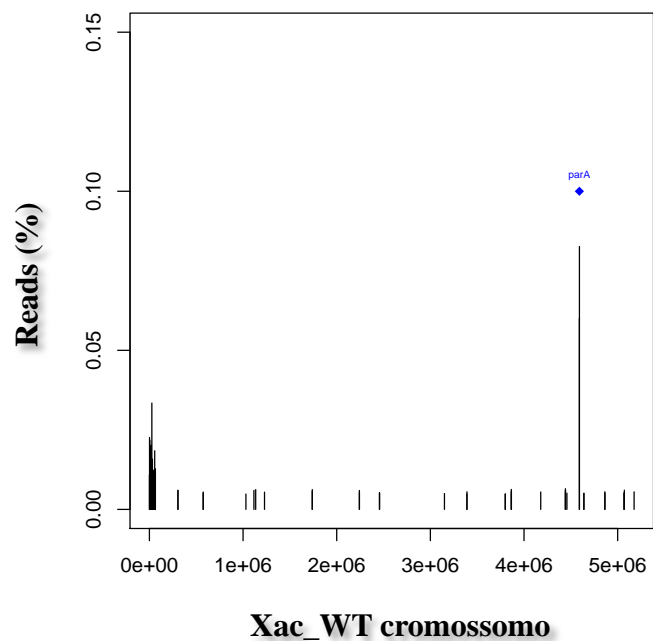
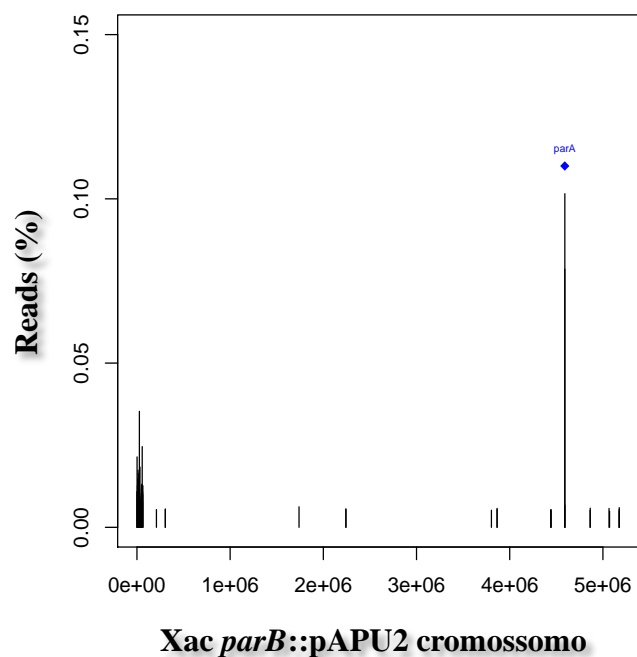
A**B**

Gráfico 2. Análise da interação de ParA de Xac ao DNA *in vivo*. As linhagens de Xac foram cultivadas em meio LB até alcançarem a fase exponencial, os complexos proteínas/DNA foram submetidos a crosslink e imunoprecipitados com anticorpo IgG. **A)** Linhagem Xac pCW510-*parA* **B)** Linhagem Xac *parB*::pAPU2 pCW510-*parA*. Os fragmentos de DNA separados através da imunoprecipitação e sequenciados (reads) está plotado versus a posição no cromossomo. Os dados estão representados em escala linear do genoma de Xac WT.

(Bartosik et al., 2014). Já em *Xac* foi detectado a alteração da virulência e motilidade em células contendo disrupção de *parB*. Portanto, para tentar desvendar a possível relação entre tais processos com proteínas Par de *Xac*, um maior detalhamento das regiões de interação de ParA ao DNA obtidos neste experimento de ChIP-Seq serão brevemente avaliadas e, posteriormente, futuras confirmações das ligações por ensaios de EMSA serão realizados.

Para finalizar, foi decidido observar a localização subcelular de ParA-GFP na linhagem *Xac parB::pAPU2*. Para isso, o plasmídeo pCW510-*parA* foi eletrotransformado nesta linhagem (*Xac parB::pAPU2 pCW510-parA*), a qual foi submetida à avaliação por microscopia de fluorescência. É revelado na figura 28 células com padrão de localização difuso de ParA-GFP nesta linhagem mutante. A localização difusa de ParA-GFP é mais um indício de atividade parcial ou não específica de ParA em *Xac parB::pAPU2*. A redução da atividade de ParA (em acordo também com os dados obtidos nos ensaios de Tn-Seq) deve estar relacionada, entre outros, com o desbalanço causado pela inativação de ParB que pode acarretar na menor propensão de ligação ao DNA. Por fim, o fato de ser sido encontrado células com ParA ausente na linhagem contendo disrupção de *parB* é mais um forte indício do envolvimento de proteínas tipo ParA no processo de segregação cromossômica em *Xac* e da necessidade de sua funcionalidade precisa para uma fiel transmissão do material genético para as células filhas.

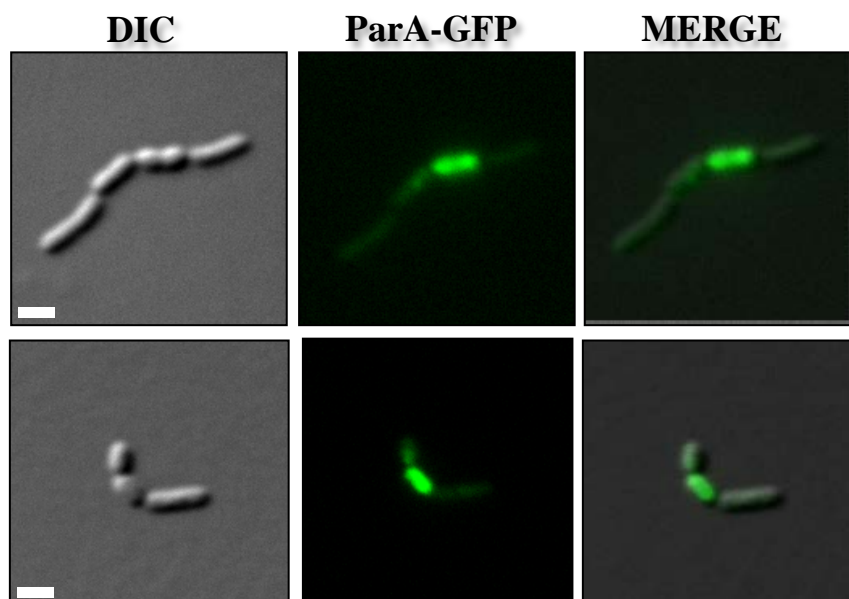


Figura 28. Localização subcelular de de ParA-GFP no mutante *Xac parB::pAPU2*. As células foram cultivadas em meio LB a 30°C até a D.O._{600nm} ~ 0,3, imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 1% e visualizadas utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência (GFP). Barras de escala correspondem a 4 µm.

CONCLUSÃO

- Xac possui o promotor *pparAB* ativo e o produto do gene *parB* pode ser detectado na forma de ParB-TAP,
- ParA e ParB são proteínas funcionais em Xac e atuam na segregação cromossômica,
- Xac possui um modelo de segregação cromossômica assimétrico,
- ParB é essencial em Xac,
- A disrupção de *parB* em Xac provoca defeitos severos de partição cromossômica (filamentação celular) e divisão celular (formação de células em cadeias), desorganização da massa cromossomal, aumento do número de células sem nucleóide, aparecimento de mini células, redução de motilidade e ausência de virulência,
- ParB possui a habilidade de se ligar inespecificamente à moléculas de DNA porém com preferência por regiões contendo *parS* e realizar spreading lateral *in vitro*,
- ParB pode se ligar ao DNA *in vivo*,
- Presença de cópias extras de sequências *parS* atrapalham a segregação cromossômica e divisão celular em Xac,
- Mutações pontuais em ParA e ParB atrapalham as funções proteicas e prejudicam os mecanismos de segregação cromossômica e/ou divisão celular,
- ParA pode se ligar ao DNA *in vivo* e mutações em *parB* alteram os sítios de ligação ParA/DNA
- Segregação cromossômica e divisão celular são mecanismos relacionados em Xac
- Xac possui o sistema de particionamento cromossomal tipo ParAB/*parS* ativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um preciso mecanismo de partição cromossômica é fundamental para assegurar a correta hereditariedade do material genético para as células filha. Durante o ciclo celular bacteriano, a segregação do cromossomo segue o início da replicação a partir da duplicação de *oriC* através de sua migração em direção ao pólo posto da célula. Proteínas ParA e ParB, juntamente com sequências específicas de DNA denominadas *parS* fazem parte da maquinaria de segregação. Apesar dos papéis das proteínas ParAB terem sido descritos em vários microrganismos, a influência destas no mecanismo de segregação do material genético de *Xac* ainda não havia sido estudada; de modo que esta é a primeira documentação sobre o processo de partição cromossômica nesta bactéria. Foi demonstrado neste trabalho, por Western blotting, que ParB é expressa de maneira estável e compõe a maquinaria de segregação cromossômica de *Xac*. ParB é localizada em cluster nas bordas do nucleóide e sua dinâmica subcelular evidencia um modelo de segregação cromossômica assimétrica em *Xac*. A disrupção de *parB* produz o clássico fenótipo de filamentação celular, formação de células em cadeias e aumenta a porcentagem de células sem material genético. Como uma das funções de proteínas tipo ParB, ParB de *Xac* pode se ligar ao DNA com preferência para sequência *parS* tanto *in vitro* quanto *in vivo* realizando spreading lateral, o que sugere a formação do complexo centromérico ParB/*parS* e implica seu envolvimento na segregação cromossômica e/ou divisão celular. Confirmando, sequências extras de *parS* em células de *Xac* causam um desbalanço dos fatores envolvidos na partição cromossômica, prejudicando a correta partição do material genético e conseqüentemente a divisão celular. Além disso, na ausência de ParB íntegra na célula, *Xac* possui taxa de crescimento reduzida, não é capaz de colonizar o hospedeiro citros e possui motilidade alterada. Interações genéticas envolvendo *parB* juntamente com a localização de ParB-GFP e ZapA-mCherry (marcador de formação do anel Z) reforçam a idéia da participação de ParB em processos essenciais da bactéria e sugerem a relação com o processo de divisão celular em *Xac*. A expressão da proteína ParA, parceira de ParB, também é expressa em *Xac* e se localiza como foci bipolar ou distribuída de maneira linear na célula. ParA também pode se ligar ao DNA de *Xac* *in vivo* e, na ausência de ParB WT, ocorre o comprometimento de determinadas regiões de ligação ParA/DNA, o que revela uma atividade alterada da proteína, provavelmente devido ao desbalanço dos níveis proteicos. Em suma, todos os dados apresentados propõem, pela primeira vez, um modelo funcional de partição cromossômica em *Xac* tipo ParAB/*parS* requerido

para a correta segregação cromossômica; sugerido através do modelo esquematizado na Figura 29. Finalizando, por não haver homólogos das proteínas tipo ParAB em células eucariotas, esse sistema pode ser considerado um potencial alvo para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos para o controle do cancro cérico, doença sem tratamento eficaz até o presente momento.

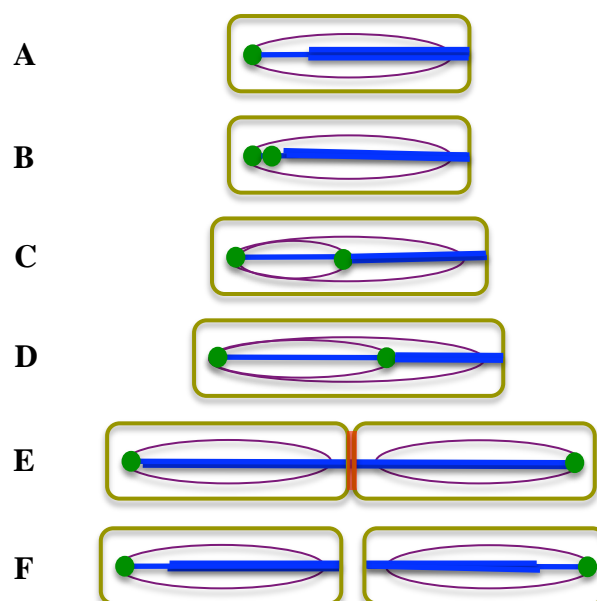


Figura 29. Modelo proposto para segregação cromossômica em Xac. Localização das proteínas ParA, ParB e ZapA durante o mecanismo de segregação cromossômica e divisão celular em Xac. **A)** O complexo nucleoproteico ParB/*parS* (círculos verdes), próximo de *oriC*, localiza-se inicialmente em um dos pólos celular. **B)** A região de origem é duplicada e o complexo ParB/*parS* interage com filamentos de proteínas ParA (traços azuis). **C)** e **D)** A retração de filamentos de ParA movimenta o complexo ParB/*parS* para o pólo celular oposto. **E)** Após segregação do material genético (elipse lilás), ocorre o início da formação do septo (representado pela proteína ZapA, retângulo vermelho) **F)** até a finalização do ciclo celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ausmees N, Kuhn JR & Jacobs-Wagner C (2003) The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**: 705-713.
- Autret S & Errington J (2001) Dynamic proteins in bacteria. *Dev Cell* **1**: 10-11.
- Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJ, Slater H, Dow JM, Williams P & Daniels MJ (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular microbiology* **24**: 555-566.
- Bartosik AA, Mierzejewska J, Thomas CM & Jagura-Burdzy G (2009) ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. *Microbiology* **155**: 1080-1092.
- Bartosik AA, Glabski K, Jecz P, Mikulska S, Fogtman A, Koblowska M & Jagura-Burdzy G (2014) Transcriptional Profiling of ParA and ParB Mutants in Actively Dividing Cells of an Opportunistic Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one* **9**: e87276.
- Bernhardt TG & de Boer PA (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Molecular cell* **18**: 555-564.
- Bowman GR, Comolli LR, Zhu J, Eckart M, Koenig M, Downing KH, Moerner WE, Earnest T & Shapiro L (2008) A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell* **134**: 945-955.
- Breier AM & Grossman AD (2007) Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Molecular microbiology* **64**: 703-718.
- Carballido-Lopez R & Formstone A (2007) Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **10**: 611-616. Epub 2007 Nov 2005.
- Chagas MCM (1999) *das. Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae): Bioecologia e relação com o cancro cítrico. Thesis, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo., Piracicaba.
- Chow KH & Courcelle J (2004) RecO acts with RecF and RecR to protect and maintain replication forks blocked by UV-induced DNA damage in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 3492-3496.
- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, *et al.* (2002) Comparison of the genomes of two

- Xanthomonas pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459-463.
- Daniel RA & Errington J (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**: 767-776.
- Das AK (2003) Citrus Canker - A review. *J Appl Hort* **5**: 52-60.
- Donovan C, Schwaiger A, Kramer R & Bramkamp M (2010) Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* **192**: 3441-3451.
- Doi M, Wachi M, Ishino F, Tomioka S, Ito M, Sakagami Y, Suzuki A & Matsushashi M (1988) Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **170**: 4619-4624.
- Donovan C, Sieger B, Kramer R & Bramkamp M (2012) A synthetic *Escherichia coli* system identifies a conserved origin tethering factor in Actinobacteria. *Mol Microbiol* **84**: 105-116.
- Dunger G, Relling VM, Tondo ML, Barreras M, Ielpi L, Orellano EG & Ottado J (2007) Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Archives of microbiology* **188**: 127-135.
- Dworkin J & Losick R (2002) Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14089-14094.
- Ebersbach G & Gerdes K (2005) Plasmid segregation mechanisms. *Annual review of genetics* **39**: 453-479.
- Ebersbach G, Briegel A, Jensen GJ & Jacobs-Wagner C (2008) A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *caulobacter*. *Cell* **134**: 956-968.
- Ely B (1991) Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods in enzymology* **204**: 372-384.
- Fels SR, Zane GM, Blake SM & Wall JD (2013) Rapid transposon liquid enrichment sequencing (TnLE-seq) for gene fitness evaluation in underdeveloped bacterial systems. *Applied and environmental microbiology* **79**: 7510-7517.
- Ferreira H, Sherratt D & Arciszewska L (2001) Switching catalytic activity in the XerCD site-specific recombination machine. *Journal of molecular biology* **312**: 45-57.
- Ferreira H, & Belasque J Jr (2011) Proceedings of the international workshop on *Xanthomonas citri/citrus canker*. Ribeirão Preto, Brazil, ISBN: 978-85-64947-

04-7, Available at (<http://www.fcfar.unesp.br/wxc/download/>)

- Figge RM, Easter J, Jr & Gober W (2003) Productive interaction between the chromosome partitioning proteins, ParA and ParB, is required for the progression of the cell cycle in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **47**: 1225-1237.
- Fogel MA & Waldor MK (2006) A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes & development* **20**: 3269-3282.
- Galvan EM, Ielmini MV, Patel YN, Bianco MI, Franceschini EA, Schneider JC & Ielpi L (2013) Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB. *Glycobiology* **23**: 259-272.
- Ghosh SK, Hajra S, Paek A & Jayaram M (2006) Mechanisms for chromosome and plasmid segregation. *Annual review of biochemistry* **75**: 211-241.
- Glaser P, Sharpe ME, Raether B, Perego M, Ohlsen K & Errington J (1997) Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes & development* **11**: 1160-1168.
- Gerdes K, Howard M & Szardenings F (2010) Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* **141**: 927-942.
- Gitai Z, Thanbichler M & Shapiro L (2005a) The choreographed dynamics of bacterial chromosomes. *Trends Microbiol* **13**: 221-228.
- Gitai Z, Dye NA, Reisenauer A, Wachi M & Shapiro L (2005b) MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* **120**: 329-341.
- Gottwald TR, Graham JH & Schubert TS (2002) Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Graumann PL (2007) Cytoskeletal elements in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**: 589-618.
- Gruber S & Errington J (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* **137**: 685-696.
- Gueiros-Filho FJ & Losick R (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes & development* **16**: 2544-2556.
- Guo Y, Sagaram US, Kim JS & Wang N (2010) Requirement of the galU gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth In Planta of

- Xanthomonas citri subsp. citri. *Applied and environmental microbiology* **76**: 2234-2242.
- Harms A, Treuner-Lange A, Schumacher D & Sogaard-Andersen L (2013) Tracking of chromosome and replisome dynamics in *Myxococcus xanthus* reveals a novel chromosome arrangement. *PLoS genetics* **9**: e1003802.
- Hui MP, Galkin VE, Yu X, Stasiak AZ, Stasiak A, Waldor MK & Egelman EH (2010) ParA2, a *Vibrio cholerae* chromosome partitioning protein, forms left-handed helical filaments on DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 4590-4595.
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews* **36**: 478-503.
- Ireton K, Gunther NWt & Grossman AD (1994) spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **176**: 5320-5329.
- Jadura-Burdzy G, Kostelidou K, Pole J, Khare D, Jones A, Williams DR & Thomas CM (1999) IncC of broad-host-range plasmid RK2 modulates KorB transcriptional repressor activity In vivo and operator binding in vitro. *Journal of bacteriology* **181**: 2807-2815.
- Jones LJ, Carballido-Lopez R & Errington J (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Katzen F, Ferreira DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Puhler A & Ielpi L (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *Journal of bacteriology* **180**: 1607-1617.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kusiak M, Gapczynska A, Plochocka D, Thomas CM & Jadura-Burdzy G (2011) Binding and spreading of ParB on DNA determine its biological function in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **193**: 3342-3355.
- Lau IF, Filipe SR, Soballe B, Okstad OA, Barre FX & Sherratt DJ (2003) Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Molecular microbiology* **49**: 731-743.
- Lee PS & Grossman AD (2006) 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*. *Mol Microbiol* **60**: 853-869.
- Lemon KP & Grossman AD (1998) Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* **282**: 1516-1519.
- Lemon KP & Grossman AD (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes & development* **15**: 2031-2041.
- Leonard TA, Butler PJ & Lowe J (2004) Structural analysis of the chromosome segregation protein Spo0J from *Thermus thermophilus*. *Molecular microbiology* **53**: 419-432.
- Leonard TA, Butler PJ & Lowe J (2005) Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer--a conserved biological switch. *The EMBO journal* **24**: 270-282.
- Lin DC & Grossman AD (1998) Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* **92**: 675-685.
- Livny J, Yamaichi Y & Waldor MK (2007) Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics. *Journal of bacteriology* **189**: 8693-8703.
- Lutkenhaus JF, Wolf-Watz H & Donachie WD (1980) Organization of genes in the ftsA-envA region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new fts locus (ftsZ). *J Bacteriol* **142**: 615-620.
- Lynch AS & Wang JC (1995) SopB protein-mediated silencing of genes linked to the sopC locus of *Escherichia coli* F plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1896-1900.
- Malamud F, Torres PS, Roeschlin R, Rigano LA, Enrique R, Bonomi HR, Castagnaro AP, Marano MR & Vojnov AA (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* **157**: 819-829.
- Marks ME, Castro-Rojas CM, Teiling C, Du L, Kapatral V, Walunas TL & Crosson S (2010) The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology* **192**: 3678-3688.
- Marston AL & Errington J (1999) Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell* **4**: 673-682.

- Mierzejewska J & Jagura-Burdzy G (2012) Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid* **67**: 1-14.
- Mohl DA & Gober JW (1997) Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* **88**: 675-684.
- Mohl DA, Easter J, Jr. & Gober JW (2001) The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* **42**: 741-755.
- Murray H, Ferreira H. & Errington J (2006) The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from *parS* nucleation sites. *Mol Microbiol* **61**: 1352-1361.
- Murray H & Errington J (2008) Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* **135**: 74-84.
- Neves MED, M, Dragone DS, Neves FM (2001) Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros 1996-2000. *Revista Brasileira de Fruticultura* **23**.
- Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F & Kalaki R (2010) Retrato da citricultura brasileira. Elaborado por MARKESTRAT: Cento de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia. FEA-USP, Ribeirão Preto 1-137.
- Ochman H & Davalos LM (2006) The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science* **311**: 1730-1733.
- Passot FM, Calderon V, Fichant G, Lane D & Pasta F (2012) Centromere binding and evolution of chromosomal partition systems in the Burkholderiales. *J Bacteriol* **194**: 3426-3436.
- Ptacin JL, Lee SF, Garner EC, Toro E, Eckart M, Comolli LR, Moerner WE & Shapiro L (2010) A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nature cell biology* **12**: 791-798.
- Quisel JD, Lin DC & Grossman AD (1999) Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Molecular cell* **4**: 665-672.
- Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, *et al.* (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **20**: 1222-1230.
- Ringgaard S, Schirner K, Davis BM & Waldor MK (2011) A family of ParA-like ATPases promotes cell pole maturation by facilitating polar localization of chemotaxis proteins. *Genes & development* **25**: 1544-1555.
- Rodionov O, Lobočka M & Yarmolinsky M (1999) Silencing of genes flanking the

- P1 plasmid centromere. *Science* **283**: 546-549.
- Salje J, Gayathri P & Lowe J (2010) The ParMRC system: molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments. *Nature reviews Microbiology* **8**: 683-692.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd Edition edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK & Vidaver AK (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **28**: 494-518.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK & Vidaver AK (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol* **29**: 690-695.
- Sharpe ME & Errington J (1998) A fixed distance for separation of newly replicated copies of *oriC* in *Bacillus subtilis*: implications for co-ordination of chromosome segregation and cell division. *Mol Microbiol* **28**: 981-990.
- Sharpe ME & Errington J (1999) Upheaval in the bacterial nucleoid. An active chromosome segregation mechanism. *Trends Genet* **15**: 70-74.
- Siciliano F, Torres P, Sendin L, Bermejo C, Filippone P, Vellice G, Ramallo J, Castagnaro A, Vojnov A & Marano MR (2006) Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathogenesis in *Citrus limon*. *Electron. J. Biotechnol* **9**: 200-204.
- Simpson AJ & Reinach FC & Arruda P, *et al.* (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**: 151-157.

- Schofield WB, Lim HC & Jacobs-Wagner C (2010) Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *EMBO J* **29**: 3068-3081.
- Silva IC, Regasini LO, Petronio MS, Silva DH, Bolzani VS, Belasque J, Jr., Sacramento LV & Ferreira H (2013) Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of bacteriology* **195**: 85-94.
- Sourjik V & Armitage JP (2010) Spatial organization in bacterial chemotaxis. *The EMBO journal* **29**: 2724-2733.
- Stall RES, C. P (1983) Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. *Plant Disease* **67**: 4.
- Thanbichler M & Shapiro L (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* **126**: 147-162.
- Thanbichler M, Iniesta AA & Shapiro L (2007) A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic acids research* **35**: e137.
- Toro E, Hong SH, McAdams HH & Shapiro L (2008) *Caulobacter* requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15435-15440.
- Ucci AP, Martins PM, Lau IF, Bacci M, Jr., Belasque J, Jr. & Ferreira H (2014) Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *MicrobiologyOpen* **3**: 29-41.
- van Opijnen T, Bodi KL & Camilli A (2009) Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nature methods* **6**: 767-772.
- Vecchiarelli AG, Han YW, Tan X, Mizuuchi M, Ghirlando R, Biertumpfel C, Funnell BE & Mizuuchi K (2010) ATP control of dynamic P1 ParA-DNA interactions: a key role for the nucleoid in plasmid partition. *Molecular microbiology* **78**: 78-91.
- Viollier PH, Thanbichler M, McGrath PT, West L, Meewan M, McAdams HH & Shapiro L (2004) Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9257-9262.

- Vojnov AA, Zorreguieta A, Dow JM, Daniels MJ & Dankert MA (1998) Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* **144** (Pt 6): 1487-1493.
- Webb CD, Teleman A, Gordon S, Straight A, Belmont A, Lin DC, Grossman AD, Wright A & Losick R (1997) Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell* **88**: 667-674.
- Webb CD, Graumann PL, Kahana JA, Teleman AA, Silver PA & Losick R (1998) Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **28**: 883-892.
- Wu LJ & Errington J (2003) RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 1463-1475.
- Wu LJ & Errington J (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*.
- Yamaichi Y, Fogel MA & Waldor MK (2007) par genes and the pathology of chromosome loss in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 630-635.
- Yamaichi Y, Bruckner R, Ringgaard S, Moll A, Cameron DE, Briegel A, Jensen GJ, Davis BM & Waldor MK (2012) A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes & development* **26**: 2348-2360.

Capítulo 11

ORIGINAL RESEARCH

Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*Amanda P. Ucci¹, Paula M. M. Martins², Ivy F. Lau¹, Maurício Bacci Jr², José Belasque Jr³ & Henrique Ferreira^{1,2}¹Depto. de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara/Jaú Km 1, CP 502, Araraquara, São Paulo 14801-902, Brazil²Depto. de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Rio Claro, São Paulo 13506-900, Brazil³Fundo de Defesa da Citricultura, Av. Dr. Adhemar P. de Barros, 201, Araraquara, São Paulo 14807-040, Brazil**Keywords**

Cell division arrest, chromosome segregation, citrus canker.

Correspondence

Henrique Ferreira, Depto. de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara/Jaú Km 1, CP 502, Araraquara, São Paulo 14801-902 Brazil. Tel: +55 19 3526 4187; Fax: +55 16 3301 6940; E-mail: henrique.ferreira@linacre.oxon.org

Funding Information

A. P. U. and P. M. M. received scholarships from FAPESP (2010/02041-8) and CNPq (142293/2009-1), respectively. This work was funded by FAPESP (grants 2004/09173-6; 2010/05099-7). Beneficiário de auxílio financeiro da CAPES, Brasil.

Received: 21 August 2013; Revised: 24 October 2013; Accepted: 4 November 2013

doi: 10.1002/mbo3.145

Abstract

This study was intended to characterize the chromosome segregation process of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (Xac) by investigating the functionality of the ParB factor encoded on its chromosome, and its requirement for cell viability and virulence. Using TAP tagging we show that ParB is expressed in Xac. Disruption of *parB* increased the cell doubling time and precluded the ability of Xac to colonize the host citrus. Moreover, Xac mutant cells expressing only truncated forms of ParB exhibited the classical phenotype of aberrant chromosome organization, and seemed affected in cell division judged by their reduced growth rate and the propensity to form filaments. The ParB-GFP localization pattern in Xac was suggestive of an asymmetric mode of replicon partitioning, which together with the filamentation phenotype support the idea that Xac may control septum placement using mechanisms probably analogous to *Caulobacter crescentus*, and perhaps *Vibrio cholerae*, and *Corynebacterium glutamicum*. Xac exhibits asymmetric chromosome segregation, and the perturbation of this process leads to an inability to colonize the host plant.

Introduction

Citrus canker is a serious disease present in the major citrus-producing areas around the world. Currently, there are no effective curative measures to safeguard the orchards, where the eradication of affected trees is the only reliable method to prevent the spread of the causal agent Xac to regions where it has not been detected (Gottwald et al. 2002). The eradication of plants is a highly controversial, costly, and difficult method to control citrus can-

ker. In addition, its effectiveness is only possible in areas with very low incidence of the disease (Belasque et al. 2010). Other control measures have been adopted in areas where citrus canker is endemic or the eradication of affected trees is not mandatory. These methods, collectively known as the disease management approach, include distinct cultivation strategies, the use of chemical formulations to contain the spread of Xac, and the plantation of citrus genotypes displaying relative resistance to citrus canker. The disease management approach is there-

fore intended to minimize and/or prevent damages and losses promoted by citrus canker, such as blemish on fruits, symptomatic fruit drop, defoliation, and stem die-back (Behlau et al. 2010).

Citrus canker has an endemic status in some of the main citrus-producing areas in the world, the state of Florida, USA, and in the southern portion of South America. In Florida, the eradication program was abandoned in January 2006, and as a consequence, citrus canker is spreading throughout the region. In both areas, growers adopt the disease management system. On the other hand, the state of São Paulo, Brazil, still keeps an eradication program with mandatory elimination of foci of the disease; however, due to a diminished effort to detect and eradicate infected trees, citrus canker is becoming an epidemic (see references within Ferreira and Belasque [2011]). As a result, in some years growers may have to manage citrus canker in the state of São Paulo as it is already done in the southern states of Brazil. For these reasons in depth knowledge of the biology of Xac may help in the development of strategies to control and minimize the losses caused by this plant pathogen.

Recently, we characterized some esters of gallic acid that interfere with the subcellular localization of ParB-green fluorescent protein (GFP) and also GFP-ZapA in Xac (Silva et al. 2013). As ParB and ZapA are components of the bacterial chromosome segregation (segrosome) and cell division (divisome) machineries (Gueiros-Filho and Losick 2002; Mierzejewska and Jagura-Burdzy 2012), respectively, alkyl gallates are believed to target components of the segrosome and/or the divisome (Silva et al. 2013). ParB-like factors are DNA-binding proteins encoded on plasmids or on the chromosomes of many bacteria (Leonard et al. 2005b; Gerdes et al. 2010; Mierzejewska and Jagura-Burdzy 2012). They act together with cognate ATPases, ParA-like factors, to operate efficient replicon segregation in prokaryotes. Segregation of low copy number plasmids and chromosomes requires the specific interaction of ParB with short *cis*-acting elements designated *parS*, which on bacterial chromosomes are normally located around the origins of replication (Livny et al. 2007). Homology searches showed that Xac possesses at least one of these *cis* elements (TGTTCCACGTGGAACG; genomic coordinates c2753..2768), which is located right at the 3'-end of the *dnaN* gene on the bacterial chromosome (Livny et al. 2007). Active segregation of ParB-*parS* complexes (also known as the bacterial centromeres), and consequently the origins of replication, occurs with the help of ParA filaments that help to orient newly replicated chromosomes to opposite positions within the cells, a mechanism elegantly demonstrated for the models *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) and *Caulobacter crescentus*

(*C. crescentus*) (Fogel and Waldor 2006; Ptacin et al. 2010). In the case of ZapA, this protein is well conserved among *Bacteria*, and shows septal localization dependent on FtsZ (Gueiros-Filho and Losick 2002). ZapA stimulates FtsZ polymer bundling, as well as the cross-linking of FtsZ filaments, which is believed to stabilize the Z-ring during cytokinesis (Gueiros-Filho and Losick 2002; Low et al. 2004; Mohammadi et al. 2009; Dajkovic et al. 2010).

The fact that alkyl gallates are able to target at once chromosome segregation and cell division in Xac is supported by demonstrations that these processes are interlinked in other bacteria, for example, *C. crescentus*, *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*), *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), and *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) (Easter and Gober 2002; Thanbichler and Shapiro 2006a; Jakimowicz et al. 2007; Donovan et al. 2010; Ginda et al. 2013). In *S. coelicolor*, for instance, ParAB is required for proper distribution of chromosomal copies within the aerial hyphae during sporulation (Jakimowicz et al. 2005, 2007). ParB bound to the *oriC* region organizes segregation complexes, while ParA coordinates their spatial distribution for a concomitant assembly of multiple septa. Therefore, lack of ParA interferes not only with chromosome segregation but also with septum placement in *S. coelicolor* (Jakimowicz et al. 2007). In *C. crescentus*, MipZ, an inhibitor of FtsZ polymerization, follows ParB/*parS* precluding the formation of the Z-ring at sites other than in the middle of the cells (Thanbichler and Shapiro 2006a; Kiekebusch et al. 2012). In a recent model, ParB/DNA was proposed to catalyze the conversion of MipZ monomers into the active/dimeric inhibitor of FtsZ, and given the polar localization of ParB/DNA in *C. crescentus*, a cloud of active inhibitor is formed and surrounds the polar regions of the cells (Kiekebusch et al. 2012). In the case of *M. smegmatis*, deletion of *parA* produced aberrant septum placement (Ginda et al. 2013); this phenotype was attributed to overall chromosome disorganization, and it was suggested that another factor, maybe analogous to MipZ, could link both processes. Finally, *C. glutamicum* possesses an orphan *parA*-like gene that codes for a protein designated PldP (ParA-like division protein) (Donovan et al. 2010). Mutation of *pldP* had just a mild effect on segregation producing a slight increase in the number of anucleate cells, and over-expression led to cell elongation; however, a fluorescent form of PldP localized close to the septum, and protein interaction analysis showed that PldP associated with both ParB and ParA, making it a possible candidate for a septum inhibitor.

Here, we report on the role of ParB in the chromosome segregation process of Xac. Using a tandem affinity purification (TAP)-TAG version of ParB (ParB-TAP), we demonstrate that this protein is stably expressed in Xac.

Disruption of ParB from Xac severely compromised cell division and the ability to induce disease symptoms in *planta*. Subsequent analyses of the ParB-GFP subcellular localization pattern coupled to the observation that chromosome segregation and cell division may be interlinked in this plant pathogen raised the hypothesis that the strategies used by Xac to deal with these tasks resembles those that have been described for the model organism *C. crescentus* (Thanbichler and Shapiro 2006b).

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids

The strains and plasmids used are listed in Table 1; oligonucleotides are listed in Table S1. *E. coli* was cultivated at 37°C in luria broth (Sambrook et al. 1989); Xac was cultivated at 30°C in nutrient yeast glycerol (NYG) (Daniels et al. 1984). The TAP-tag expression vector pHF5Ca (**FJ562210**) is a variant of pPM2a (Martins et al. 2010). To construct pHF5Ca, we substituted the *gfpmut1* cassette of pPM2a by the *tap1479*, which was extracted from pBS1479 (Puig et al. 2001) using PCR with primers PBS1479F/PBS1479R; *gfpmut1* was released from pPM2a by a *Bam*HI/*Xba*I digest, whereas *tap1479* was treated with the same enzymes prior to ligation. The ParB-TAP expression vector, pAPU1, was constructed by the ligation of *parB* (PCR amplified from the chromosome of Xac with primers ParBF20070822/ParBR20080530) into the *Bam*HI site of pHF5Ca. pAPU2 was generated by the ligation of *parB124-769* (PCR amplified using primers parBintF/parBintR), into the cloning vector pCR-2.1-TOPO (Invitrogen, Grand Island, NY). The ParB-GFP expression plasmid, pAPU3, is

a derivative of pPM7g, which carries the *parB* gene (PCR amplified with primers ParBF20070822/ParB20100309) ligated between *Bam*HI/*Xho*I restriction sites.

General methods

Electrotransformation of Xac was followed (Ferreira et al. 1995). Southern and Western blot analyses were carried out following the instructions contained into the DIG (Roche, Indianapolis, IN) and the Amersham (GE, Fairfield, CT) ECL Western blotting kits, respectively. To detect ParB-TAP we used a horseradish peroxidase-conjugated anti-horse (IgG) raised in rabbits as an unique antibody (Sigma-A6917, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Pathogenicity tests

The host plant used was Rangpur lime (*C. limonia* Osbeck). Citrus plants were cultivated under greenhouse conditions at 25–35°C. For the infiltration tests, Xac cells were cultivated in NYG medium until the OD_{600 nm} of ~1. Cells were subsequently diluted to 10⁵ colony forming unit (CFU)/mL in PBS 1X, and infiltrated on the abaxial surface of leaves using hypodermic syringes without needles. Symptoms were observed during the course of 60 days. All the tests were performed in triplicates.

Microscopy

Wild-type and mutant strains of Xac were immobilized onto agarose-covered slides for microscope observations as previously described (Martins et al. 2010). Cells were visualized using an Olympus BX-61 microscope and doc-

Table 1. Strains and plasmids.

	Relevant characteristics ¹	References
<i>Strain</i>		
<i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	IBSBF 1594; formerly known as <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> strain 306 (Xac); Ap ^R	da Silva et al. (2002), Schaad et al. (2005, 2006)
<i>E. coli</i> DH10B	Cloning strain	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Protein expression strain (pET system)	Novagen
Xac <i>amy</i> ::pAPU1	pHF5Ca- <i>parB</i> integrated into the <i>amy</i> locus of Xac; Ap ^R Km ^R	This work
Xac <i>parB</i> ::pAPU1	pHF5Ca- <i>parB</i> integrated in <i>parB</i> ; Ap ^R Km ^R	
Xac <i>parB</i> ::pAPU2	pCR-2.1-TOPO- <i>parB124-769</i> integrated in <i>parB</i> ; Ap ^R Km ^R	
Xac <i>parB</i> ::pAPU3	pPM7g- <i>parB</i> integrated in <i>parB</i> ; Ap ^R Km ^R	
<i>Plasmids</i>		
pPM2a and pPM7g	GFP expression vectors; <i>xyIR pxyI gfpmut1 bla neo</i>	Martins et al. (2010)
pHF5Ca	TAP-tag expression vector; <i>xyIR pxyI tap1479 bla neo</i>	This work
pAPU1	pHF5Ca- <i>parB</i> : <i>xyIR pxyI parB-tap1479 bla neo</i>	
pAPU2	Derivative of pCR-2.1-TOPO (Invitrogen) carrying <i>parB124-769</i> ; <i>bla neo</i>	
pAPU3	pPM7g- <i>parB</i> : <i>xyIR pxyI parB-gfpmut1 bla neo</i>	

¹Ap^R and Km^R, ampicillin and kanamycin resistance, respectively; *bla* and *neo*, genes for β-lactamase and Neomycin phosphotransferase, respectively.

umented with a monochromatic XM-10 camera. Image processing and analyses were conducted using the software Cell[^]F (Olympus, Center Valley, PA).

Statistics

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey posttest ($P < 0.05$).

Results

ParB is expressed in Xac

The annotation of the genome sequence of Xac showed the presence of at least five *parA*-like open reading frames (ORFs) with the following designations: XAC0192, XAC1907, XAC2205, XAC2433, and XAC3905. The last one, XAC3905, was found in a small operon (*parAB*) with XAC3906, which was identified as a chromosomal *parB* homologue (da Silva et al. 2002). In order to verify if *parB* was expressed in Xac, we monitored the activity of the *parAB* promoter (*pparAB*) by the ability of a Xac mutant strain to express a TAP-tagged version of ParB (ParB-TAP). This mutant was prepared by the integration of the suicide plasmid pAPU1 (carrying the fusion *parB-tap1479*) by a single crossover event into the *parB* locus of Xac (Xac *parB*::pAPU1) using an established protocol (Martins et al. 2010). Following pAPU1 integration, *parB* was duplicated, where the native copy of the gene was adjacent to the xylose promoter (*pxyl*) carried by the plasmid, whereas the *parB-tap1479* fusion had its expression governed by the native promoter of the *parAB* operon (Fig. 1B). The genomic structure of two selected Xac *parB*::pAPU1 mutants was evaluated by Southern blot using the *parB* gene as a probe (1C), and the detection of the hybridization bands of 1.031 bp and 5.615 bp confirmed the integration of pAPU1 into the *parB* locus (compare lanes 1–3 and 2–3). To detect the production of ParB-TAP by Xac *parB*::pAPU1, cells were cultivated in NYG medium until the mid-log phase, and subsequently processed for the immune detection of the TAP-tagged protein by Western blot (Fig. 1D). A signal of ~54 kDa was observed for the two mutant strains analyzed, which is consistent with the size expected for ParB-TAP (lanes 5–6). No bands could be detected for the wild-type strain (lane 7), whereas Xac transformed with the empty vector (Xac *amy*::pHF5Ca) produced a signal relative to the TAP tag of ~21 kDa (lane 8). We also included in these analyses two mutants in which pAPU1 had integrated into the *amy* locus through recombination between the *amy106-912* fragment carried by pAPU1 and the α -amylase gene of Xac (Xac *amy*::pAPU1), hence, they express ParB-TAP

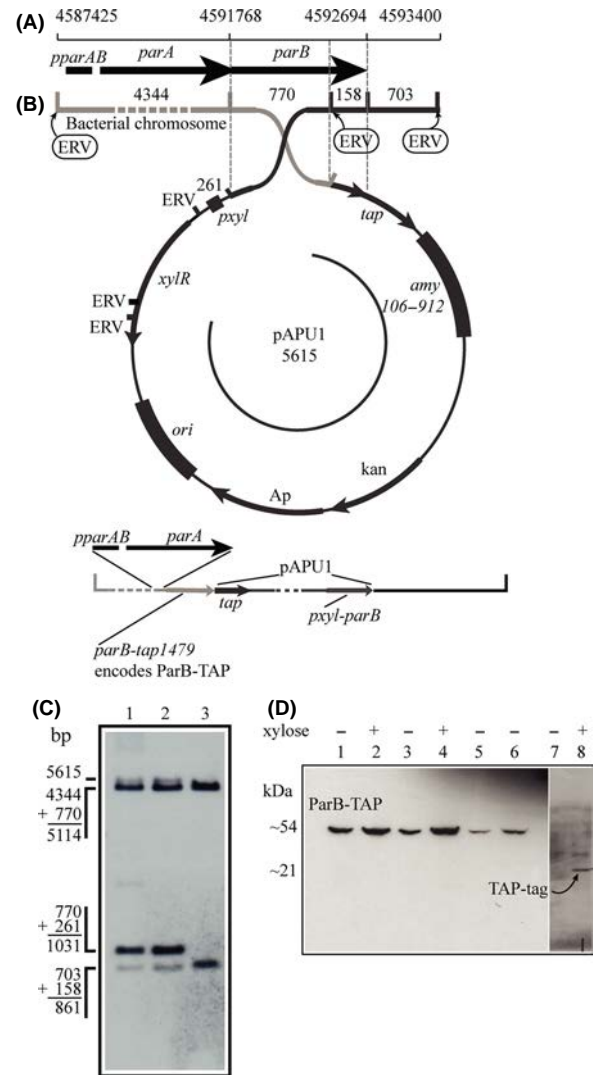


Figure 1. Activity of the Xac *parAB* operon. The activity of the *parAB* operon was demonstrated by the ability of Xac *parB*::pAPU1 mutants to express ParB-TAP under the control of the native *parAB* promoter. The ParB-TAP expression vector was integrated into the *parB* locus of Xac by a single crossover event (B) generating the genomic structure depicted at the bottom of (B). (A) Genomic coordinates of the *parAB* operon. (B) Schematics of the integration of pAPU1 (carrying the *parB-tap* fusion) into the *parB* locus. Numbers above the map and around the circle indicate the sizes in base-pairs of the DNA fragments delimited; ERV, EcoRV restriction sites. (C) Southern blot analysis of Xac *parB*::pAPU1 mutants: genomic DNA was digested with EcoRV and subsequently probed with a DIG-labeled *parB*. The sizes of the DNA fragments detected correspond to those illustrated in (B). Lanes 1 and 2, Xac *parB*::pAPU1 mutants 1 and 2, respectively; lane 3, wild-type Xac. (D) Western blot was used to detect ParB-TAP (54 kDa) in the protein extracts of Xac *parB*::pAPU1 and Xac *amy*::pAPU1 mutants. Lanes: 1–2, Xac *amy*::pAPU1 mutant 1; 3–4, Xac *amy*::pAPU1 mutant 2; 5, Xac *parB*::pAPU1 mutant 1; 6, Xac *parB*::pAPU1 mutant 2; 7, Xac wild type (negative control); 8, Xac *amy*::pHF5Ca (expresses only the TAP tag of 21 kDa). The inducer xylose was added as indicated.

ectopically to serve as a control. Note that both *Xac amy::pPAU1* mutants also express ParB-TAP, but at higher levels (compare lanes 1 and 3 with 2 and 4 for noninduced and xylose-induced cultures, respectively, with lanes 5–6). The lower expression of ParB-TAP by the *Xac parB::pPAU1* mutants is probably due to the fact that these cells have *parB-tap1479* under the control of *pparAB*, and therefore, they express ParB-TAP at physiological/natural levels. In summary, the stable production of ParB-TAP from the native *parAB* promoter confirmed the activity of the *parAB* operon in *Xac*.

***Xac parB* mutant is unable to induce citrus canker symptoms**

Several unsuccessful attempts were made to delete the *parB* gene of *Xac*. To circumvent this problem and to be able to extend our functional characterization of the

parAB operon of *Xac*, we decided to construct a mutant strain that can only express truncated forms of ParB. This was achieved by transforming *Xac* with the suicide vector pAPU2 that carried a DNA fragment corresponding to *parB124-769*. Upon integration into the *parB* locus (Fig. 2B) two new forms of *parB* should arise: one under the control of *pparAB*, which lacks the coding sequence for the 52 C-terminal residues of ParB (codes for an equivalent of ParB Δ C52, and that has a DNA addition from the vector coding for extra 18 residues not related to LacZ [Fig. 2B]), and another that can only be expressed by the activity of the *plac* promoter of pAPU2, and that codes for a LacZ α -ParB chimera (LacZ α 1-26-ParB42-308, which corresponds to a ParB deleted for the first 41 N-terminal aminoacids, ParB Δ N41). Although ParB Δ C52 carries a predicted HTH motif (Fig. 2B; residues 158–179 identified using GYM2.0; Narasimhan et al. 2002), this protein is not expected to form dimers and

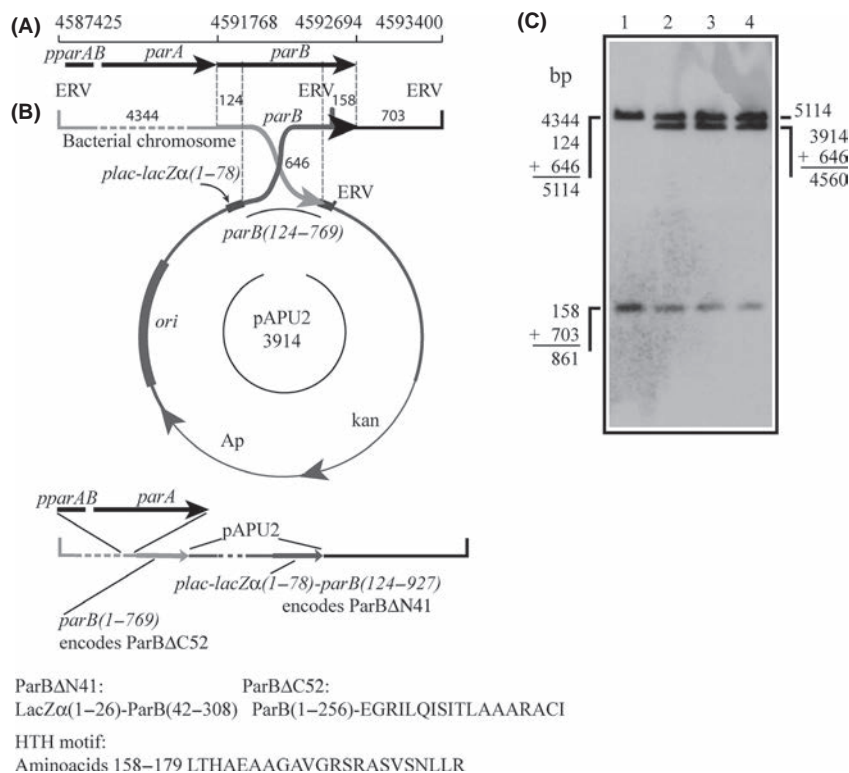


Figure 2. The strategy used to disrupt *parB* in *Xac*. The suicide vector pAPU2, which carries the *parB124-769* fragment, was integrated into the *parB* locus of *Xac* by a single crossover event; integration generated the genomic structure depicted underneath the vector in which ParB Δ C52 can be expressed under the control of the native promoter of ParB (*pparAB*). (A) Genomic coordinates of *parAB*. (B) Schematics of integration: upon plasmid insertion, two new forms of *parB* will be generated: one coding for ParB Δ N41, a fusion between the first 26 amino acids of LacZ α (coded by the expression vector) plus residues 42–308 of ParB, and another that codes for ParB Δ C52, which lacks the 52 C-terminal residues of ParB and has an addition of the 18 new amino acids shown. Both truncated ParB proteins still carry the helix-turn-helix (HTH) motif shown. The numbers above the map and around the circle indicate the sizes of the DNA fragments delimited; the predicted helix-turn-helix motif of ParB is depicted below the drawings; ERV, EcoRV restriction sites. (C) Southern blot analysis: total DNA of the three *Xac parB::pAPU2* mutants was digested with EcoRV, and probed with *parB*. The sizes of the hybridization fragments detected correspond to those estimated based on the genomic coordinates shown in B.

should be impaired in DNA binding (by analogy to data from the biochemical characterization of Spo0J Δ 20, and also of a C-terminal deletion form of ParB from *Thermus thermophilus* (Leonard et al. 2004; Murray et al. 2006); and H. Ferreira and J. Errington, unpublished data). On the other hand, ParB Δ N41, if correctly expressed and folded, would be compromised in its ability to interact and/or stimulate the ParA partner as demonstrated for the ParAB system of *T. thermophilus* (Leonard et al. 2005a).

Upon transformation of *Xac* with pAPU2, and the expected integration of this plasmid into the bacterium chromosome, the genomic context surrounding the *parB* locus of three independently selected *Xac parB::pAPU2* mutants, which were derived from the same disruption event, was checked by Southern blot (Fig. 2C), where the observation of the diagnostic hybridization band of 4.560 bp confirmed the alterations. The three mutant strains exhibited a slower growth rate when compared with the wild-type strain. Growth curves of these mutants displayed a slower doubling time on the first 24 h, being only able to reach the usual culture limit for *Xac* ($OD_{600\text{ nm}} \sim 2$) after 30 h of growth. This contrasts with the 18 h normally taken by the wild-type strain to approach the growth peak (Figure S1). Note that it took twice as much for the mutant to get to the same culture limit of $OD_{600\text{ nm}} \sim 2$. Furthermore, the recovery of kanamycin-resistant mutants after transformation took almost 5 days (120 h), whereas wild-type colonies become visible in up to 48 h.

As a plant pathogen, the ability to colonize its host is a vital process for *Xac*. Since the disruption of *parB* altered the growth pattern of the *Xac parB::pAPU2* mutants on rich medium, we tested whether these cells would still be able to colonize citrus plants. The three *Xac parB::pAPU2* mutants were infiltrated in leaves of Rangpur lime alongside the wild-type strain. While the region inoculated with the wild-type strain evolved eruptive-corky and brownish lesions surrounding the infiltration point, none of the mutant strains was capable of inducing the typical symptoms of citrus canker (Fig. 3), even after the long incubation periods of 60 days. We conclude that disruption of *parB* in *Xac* retarded the cell doubling time and promoted a loss of the ability to colonize the host citrus.

Alteration of the normal ParB function disrupts cell division in *Xac*

Disruption, deletion, and/or the overexpression of ParB-like proteins in several microorganisms, including *C. crescentus*, *C. glutamicum*, and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), may lead to pleiotropic effects such as cell filamentation, loss of motility, and perturbations in the

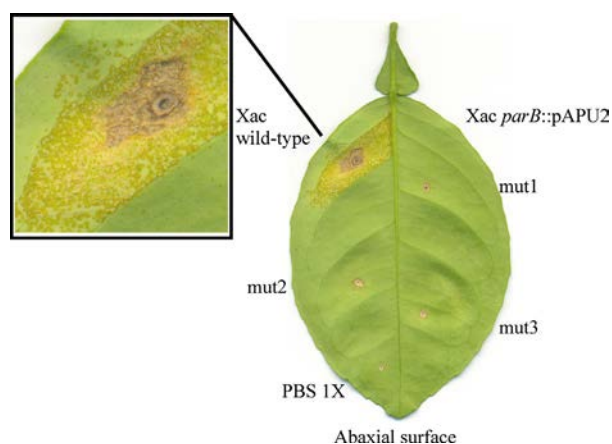


Figure 3. *Xac* mutants disrupted for *parB* are unable to colonize the host citrus. Three *Xac parB::pAPU2* mutants were inoculated in leaves of Rangpur lime alongside the wild-type *Xac* and the diluent PBS 1X. Only *Xac* wild type was capable of inducing the typical symptoms of citrus canker as eruptive lesions within chlorotic spaces. Infected plants were kept in green house for a period of 60 days in order to score for the appearance of citrus canker symptoms. Here, we show a representative experiment; tests were performed in triplicates.

basic processes of chromosome segregation and cell division (Mohl and Gober 1997; Bartosik et al. 2009; Donovan et al. 2010). In this work, the inability to colonize citrus observed for *Xac parB::pAPU2* could be a consequence of at least two other deficiencies beyond the perturbation of the segrosome: (1) metabolic and/or physiological alterations, and (2) the perturbation of pathogenicity systems/factors indirectly triggered by the disruption of *parB*. To eliminate such possibilities, we began by examining the mutants under the microscope in order to detect any morphological changes in the cells that could support a segregation defect.

In general, cultures of the *parB* mutant *Xac parB::pAPU2* had a mix of filaments and rods (Figs. 4, 5). Percentages of the entire cell types documented are shown in Table 2. Filaments and/or irregular chains were approximately 5% of the cell types in a culture ($n = 400$) (Fig. 5). Close inspection of these filamented cells showed the presence of septal constrictions (arrows in Fig. 5), in which the division pattern displayed seems as if a particular rod started to grow and divide normally, losing the ability to form septa in successive cellular cycles; thus, filamentation seems to happen with elder rods attached to their tips. Despite the propensity to grow in long filaments, the division machinery seems operative in these mutants.

Considering the nonfilamented cells of *Xac parB::pAPU2*, they looked apparently longer than the wild-type strain (compare Fig. 4A and B; Table 2). In order to quantitatively evaluate this, we measured 200 individuals

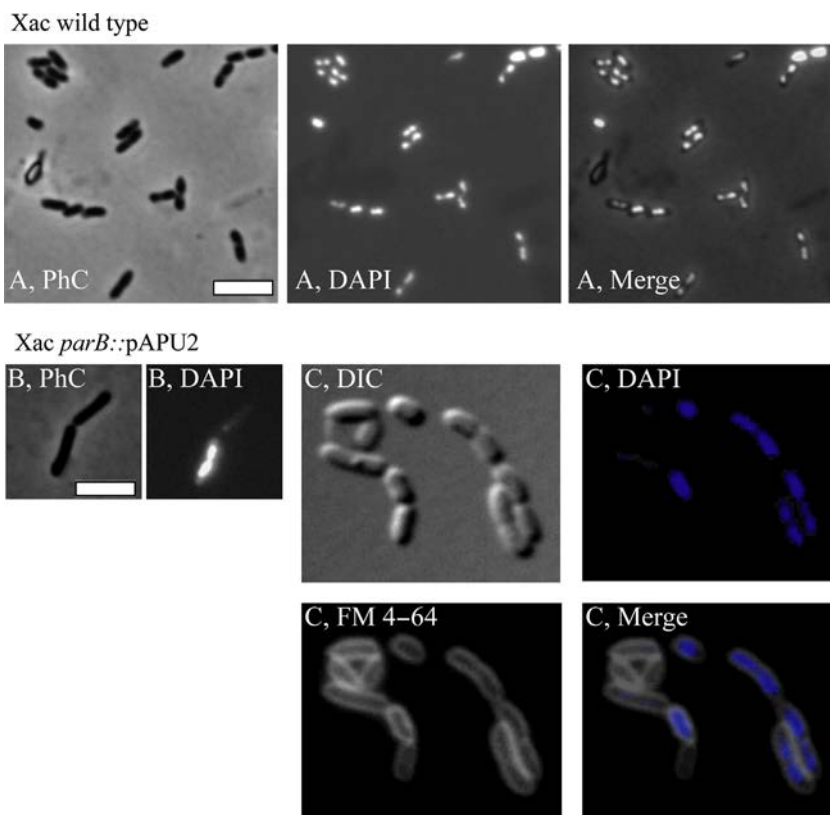


Figure 4. Morphological analysis of *Xac parB::pPAU2* mutant cells. The *Xac parB::pPAU2* mutant, which expresses only truncated forms of ParB, was compared with *Xac* wild type using various combinations of phase contrast (PhC), differential interference contrast (DIC), and fluorescence microscopy; the membrane and nucleoid stains FM 4–64 and DAPI, respectively, were used as indicated. Wild-type and mutant cells were cultivated in NYG medium at 30°C, and inspected around the $OD_{600\text{ nm}} \sim 0.3$; cells were immobilized onto 1% agarose-covered slides. (A) *Xac* wild type. (B–C) *Xac parB::pPAU2*. Scale bar corresponds to 4 μm .

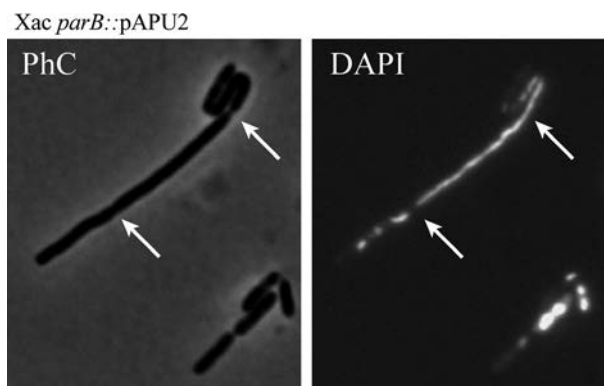


Figure 5. The filamentation phenotype of *Xac parB* mutant. The *Xac parB* mutant (*Xac parB::pPAU2*) was investigated under phase contrast (PhC) and fluorescence microscopy of DAPI-stained cells (DAPI) in order to evaluate their chromosome organization. Here, we show the picture of a representative filament from cells cultivated in NYG medium at 30°C, and visualized around the $OD_{600\text{ nm}} \sim 0.3$; arrows show the closure of septa; on the right (DAPI), septum is closing without chromosome clearance. Scale bar corresponds to 4 μm .

of each culture (wild-type and *Xac parB::pPAU2*), and calculated the average cell length. We observed significant differences between them: the average wild-type cell

Table 2. Morphological analysis of *Xac parB::pPAU2*.

	Cell length ($n = 200$), μm	Filaments ($n = 400$)	Anucleate	Minicells
<i>Xac</i> wild type	1.44 ± 0.31	0	0	0
<i>Xac parB::pPAU2</i>	$2.56 \pm 0.42^*$	5%	30%	0

Data correspond to the average cell length \pm standard deviation.
* $P < 0.05$; One-way ANOVA with Tukey posttest.

length was $1.44 \pm 0.31 \mu\text{m}$, whereas the *Xac parB::pPAU2* mutants measured $2.56 \pm 0.42 \mu\text{m}$.

To subsequently estimate the effects of *parB* disruption on the chromosome organization of *Xac parB::pPAU2*, cells were labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and visualized by fluorescence microscopy (Figs. 4, 5). Cultures of *Xac parB::pPAU2* exhibited an increase in the number of anucleate rods ($\sim 30\%$ of the cell types, Fig. 4B and C), which contrasts with an absence of DNA-free cells in cultures of wild-type *Xac* (Table 2). When we looked at filamented cells of the *Xac parB* mutant, we observed a considerable accumulation of chromosomal mass, sometimes adopting the form of a continuum in which the nucleoid fills up the whole of a cell compartment extending through and preventing the closure of a septum (Fig. 5; arrow on the right). Minicells

were not detected neither in cultures of Xac wild-type nor in the *parB* mutant (Table 2). Altogether, data show that the disruption of *parB* in Xac leads to a severe impairment of the chromosome segregation process, which also culminated in an unexpected alteration of its ability to stimulate citrus canker symptoms.

Subcellular localization of ParB-GFP

The localization patterns of several chromosomally encoded ParB-like proteins have been documented in vivo and it constitutes an excellent indicative of function in chromosome segregation (Glaser et al. 1997; Mohl and Gober 1997; Jakimowicz et al. 2005; Fogel and Waldor 2006; Bartosik et al. 2009; Maloney et al. 2009; Donovan et al. 2010). To further extend our characterization of Xac ParB, we prepared a mutant strain, Xac *parB*::pAPU3, which expresses ParB-GFP under the control of *pparAB* at physiological levels (Fig. 6) (Xac *parB*::pAPU3 was constructed using the same strategy depicted above for the expression of ParB-TAP). In Figure 6A (I and II), we show the localization of ParB-GFP in cells without a clear sign of septal constriction. Note the presence of two foci per compartment, each occupying one of the cellular poles. This localization pattern was very similar to the one documented for the ParB homologue of *C. crescentus* (Mohl and Gober 1997). Inspection of several fields revealed another localization pattern in which the ParB-GFP focus is splitting in two in just one of the cellular compartments (Fig. 6A-III, arrow), whereas in the other it apparently remains as a single entity. The pattern seen in Figure 6A-III is probably a resultant of either the initiation of a new replication event in only one of the cell compartments, at a late stage of septation (which implies

an asynchrony in the process of initiation of chromosome replication), or the brighter individual focus would in fact be two ParB-GFP foci superimposed. We favor the latter possibility as we also observed localization patterns in which the cells seemed to be in synchrony with regard to the initiation of replication (Fig. 6B). In Figure 6B-I, we see dividing cells and two closely positioned ParB-GFP foci occupying in each compartment just one of the polar regions. Here, new replication events that would separate the origin regions of the chromosomes are taking place at the poles; hence, the replisomes should be nearby. The cellular type shown in Figure 6B-II (a nondividing rod) seems to support the idea that the origins in Xac initiate replication toward one of the cellular poles, which is similar to the replication patterns exhibited by *C. crescentus*, *V. cholerae*, and *C. glutamicum* (Mohl and Gober 1997; Fogel and Waldor 2006; Donovan et al. 2010). Finally, we performed DAPI staining of cells and captured individuals in late stages of septum closure judged by the placement of the ParB-GFP foci within the cells (Fig. 6C). We observed four ParB-GFP foci evenly distributed inside the two linked cell compartments, where ParB-GFP colocalizes with the edges of the nucleoids. If we consider that these edges comprise the origins of replication, similar to *B. subtilis* and many other systems (Leonard et al. 2005b; Mierzejewska and Jagura-Burdzy 2012), *parS* in Xac is located in this region (at ~3 kb from the origin in the chromosome of Xac (Livny et al. 2007)) and ParB-GFP is expected to be bound to it.

In Figure 6B-II, we showed evidence that Xac initiates chromosome replication close to a cellular pole. This suggests that chromosome segregation is asymmetric in this plant pathogen as it was also proposed for *C. crescentus*, *V. cholerae*, and *C. glutamicum* (Fogel and Waldor 2006;

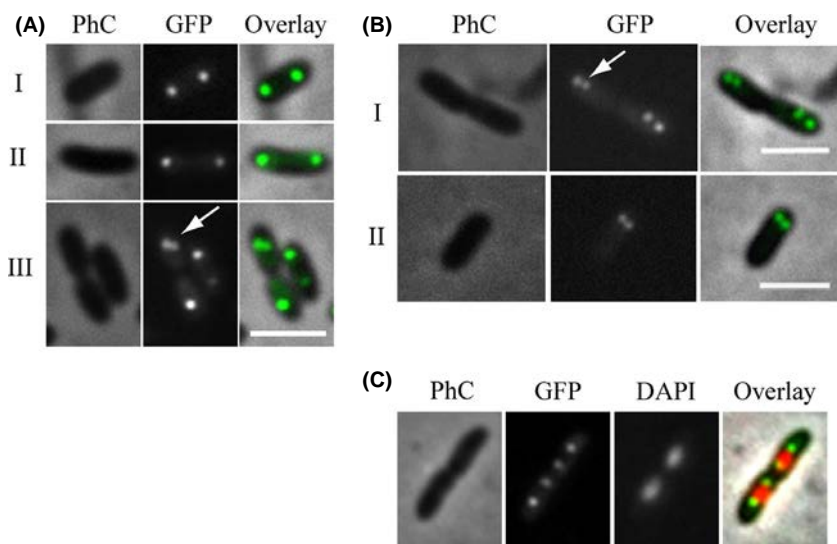


Figure 6. Localization of ParB-GFP. The localization pattern of ParB-GFP was analyzed in different cell types of a Xac *parB*::pAPU3 expressing ParB-GFP from the native *pparAB* promoter. (A, B, C) represent cells photographed during different moments of the cell cycle; arrows mark recently divided origins of replication (see text). Cells were cultivated in NYG medium at 30°C until the OD_{600nm} of ~0.3, immobilized onto 1% agarose-covered slides, and visualized using fluorescence microscopy. Scale bar corresponds to 4 μm. PhC, phase contrast; DAPI, nucleoid stain.

Donovan et al. 2010; Ptacin et al. 2010). In order to further characterize the asymmetric pattern of chromosome segregation in *Xac*, we performed time-lapse microscopy using *Xac parB::pAPU3* (Fig. 7). From $t = 0$ to $t = 20$ min the leftmost dividing rods started new chromosomal replication events that can be seen by the division of the ParB-GFP foci (arrows in $t = 20$ min). Note that at the beginning of the process (from $t = 0$ until $t = 20$), the origins of replication, and consequently the ParB-GFP foci associated with them, were situated near the cellular poles and opposite to the septum. From $t = 20$ to $t = 40$, we see the innermost origins/ParB-GFP foci moving toward the septum until they reach the

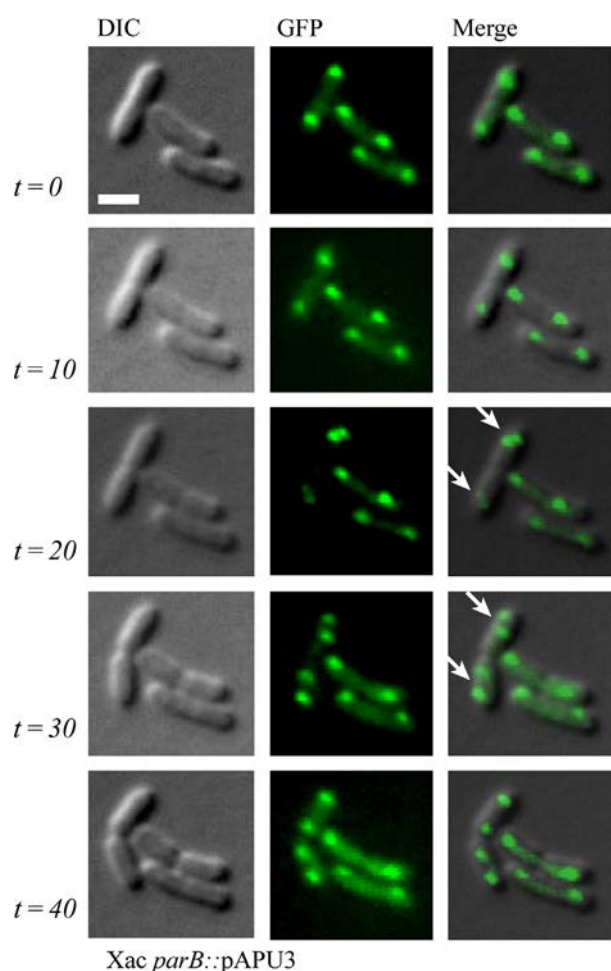


Figure 7. Time-lapse microscopy of *Xac parB::pAPU3*. The localization of ParB-GFP in *Xac parB::pAPU3* evidences an asymmetric mode of chromosome partitioning. Cells were cultivated in NYG medium at 30°C until the OD_{600nm} of ~ 0.3 , and photographed at 0, 10, 20, 30, and 40 min as indicated. Arrows mark cells in which the replication origins have divided near the cellular poles (see text). DIC, differential interference contrast microscopy. Scale bar corresponds to 4 μ m.

region that will become the new pole after cytokinesis. Therefore, we conclude that *Xac* exhibits asymmetric chromosome segregation.

Discussion

We demonstrated recently that esters of gallic acid perturbed the cell division and/or the chromosome segregation apparatuses of *Xac*. Thus, these compounds constitute promising antimicrobial agents against citrus canker and probably other bacterial diseases (Silva et al. 2013). Here, we further characterized the *Xac* mutant strain used by Silva et al. (2013) that is labeled for the centromere (*Xac parB::pAPU3*), and extended the studies with ParB encoded by this plant pathogen. First, we showed that *Xac* ParB is stably expressed and operates on chromosome segregation. Chromosomally encoded ParB-like proteins have been characterized in several bacteria (recently reviewed by (Mierzejewska and Jagura-Burdzy 2012)), where the perturbation of their normal function and/or their cellular dosage with respect to their associated ParA partners often lead to an increase in the number of anucleate cells, cell filamentation, and nucleoid disorganization. Disruption of *parB* in *Xac* produced these classical phenotypes (Figs. 4, 5). In addition, in the absence of full-length ParB, *Xac* was not able to colonize the host citrus (Fig. 3). Second, the subcellular localization of ParB-GFP suggests an asymmetric mode of replicon segregation in *Xac*, which resembles the chromosome segregation patterns observed for *C. crescentus*, *V. cholerae*, and *C. glutamicum* (Fogel and Waldor 2006; Donovan et al. 2010; Ptacin et al. 2010). This, along with the fact that lack of ParB produced a remarkable cell filamentation phenotype suggests that ParB may be involved with cell division in *Xac*.

The inability to produce disease symptoms *in planta* documented for the *Xac parB* mutant is a novel effect, which reinforced our previous observations that alkyl galates that were able to perturb the subcellular localization of ParB-GFP also precluded the ability of *Xac* to colonize citrus (Silva et al. 2013). In the past decade, several studies gradually unveiled the participation of ParAB proteins with various cellular processes other than chromosome segregation. In *P. aeruginosa*, for example, absence of ParB altered bacterial growth and affected swarming and swimming motilities (Lasocki et al. 2007; Bartosik et al. 2009). Slower growth rates were also detected in our experiments for the *parB* mutant of *Xac*. In *C. crescentus*, it was demonstrated that ParB operates on cell division by sequestering the FtsZ inhibitor MipZ to areas away from the cell center where the divisome should assemble (Thanbichler and Shapiro 2006b; Kiekebusch et al. 2012). In the Gram-positive bacterium *B. subtilis* the ParB-like

protein Spo0J recruits structural maintenance of chromosomes to the origin of replication where it was proposed to assist in the organization of the region to enable more efficient chromosome segregation (Sullivan et al. 2009). Although Spo0J may help in replicon partition, it is required for sporulation in *B. subtilis*, and recently it has also been implicated with the control of initiation of DNA replication by modulating the action of the ParA-like factor Soj (Ireton et al. 1994; Scholefield et al. 2011). The involvement of ParAB proteins with control of DNA replication was also reported for *V. cholerae* (Kadoya et al. 2011). We are not certain yet whether the pathogenicity shutdown following *parB* disruption in Xac has any association with pathogenicity systems/routes encoded by the bacterium. We have employed yeast two-hybrid analyses in an attempt to identify interactions of ParB with factors belonging to known pathogenicity systems in Xac (A. Ucci, S. C. Farah, and H. Ferreira, unpubl. results); but so far, nothing was detected. Therefore, we believe that the loss of virulence may well be simply a response to the perturbation of the vital cellular processes of chromosome segregation and/or cell division.

In this work, we showed evidence for asymmetric chromosome segregation in Xac (Figs. 6, 7). First, we see newly duplicated origins of replication labeled with ParB-GFP occupying just one of the cellular poles (Figs. 6B-I, 7). Later, the two ParB-GFP foci are well separated from each other within the same cellular compartment (Figs. 6C, 7), which suggests that segregation occurs with the internally located origins migrating from the point of duplication toward the opposite pole (Fig. 7). Asymmetric chromosome segregation was documented for *C. crescentus*, *V. cholerae*, and *C. glutamicum* as well (Fogel and Waldor 2006; Donovan et al. 2010; Ptacin et al. 2010). For the most extensively characterized system, *C. crescentus*, the chromosome is oriented such that the origin of replication (designated *cori*) is close to what is called the old pole (*C. crescentus* is known for exhibiting a strict polar asymmetry, in which diverse protein factors/systems are arranged in one but not at both cellular poles at once). Before DNA replication starts, ParB is bound to *parS* located around *cori*; ParB/*parS* organizes a centromere (Toro et al. 2008) that is kept anchored to the old pole by PopZ (Bowman et al. 2008; Ebersbach et al. 2008). When replication fires, the centromere is duplicated, and one copy of this region is captured by ParA filaments that come from the opposite cell pole, where they are anchored to TipN (a factor that marks the new pole) (Ptacin et al. 2010; Schofield et al. 2010). ParB/*parS* then interacts with ParA, ParB stimulates ParA depolymerization that shortens the filament, which is followed by subsequent recapture of ParB/*parS*; orientation of the centromeric region to the new pole operates chromosome

partitioning. A related segregation mechanism was also proposed for *V. cholerae* (Fogel and Waldor 2006), which presents some differences with that of *C. crescentus*, one of which is the use of a distinct polar anchor designated HubP, which interacts with ParA (Yamaichi et al. 2012). As for *C. glutamicum*, DivIVA was demonstrated to be the factor that tethers the ParB/DNA complex at the cell pole (Donovan et al. 2012). Considering the similarities between systems, in particular the ParB-GFP subcellular localization patterns documented for *C. crescentus*, *V. cholerae*, *C. glutamicum*, and Xac, we expect to identify protein factors of equivalent functions in Xac in the near future.

The localization pattern of ParB-GFP in Xac as well as the observation that chromosome segregation and cell division may be interlinked raised the idea that Xac could control septum placement in a manner similar to *C. crescentus* (Thanbichler and Shapiro 2006b). Curiously, similar findings and suggestions were recently reported for *M. smegmatis* (Ginda et al. 2013), where deletion of *parA* produced aberrant phenotypes of chromosome segregation and septum positioning leading to cell elongation. The association of chromosome segregation and cell division in Xac was first proposed by Silva et al. (2013), who demonstrated that alkyl gallates able to perturb the localization of ParB-GFP in this bacterium apparently acted on septum assembly as well. In *C. crescentus*, septum site selection depends on the centromere migration dynamics (Thanbichler and Shapiro 2006a), where MipZ, an inhibitor of FtsZ polymerization, interacts and localizes with ParB bound to *parS* (Thanbichler and Shapiro 2006a; Kiekebusch et al. 2012). As the centromeric complexes occupy the poles, the FtsZ inhibitor MipZ is kept away from the cell center where the septum is assembled. Therefore, disruption of ParB in *C. crescentus* perturbs the control of septation and leads to cell filamentation. Xac does not have an obvious *mipZ* homologue on its genome. MipZ is conserved in α -proteobacteria, and belongs to the Mrp/MinD family of P-loop ATPases, being structurally related to the ParA superfamily members Soj and MinD (Kiekebusch et al. 2012). However, Xac carries at least four *parA*-like ORFs (XAC0192, XAC1907, XAC2205, and XAC2433) that could have a *mipZ* function, which we shall investigate experimentally soon. Another possibility would be that Xac utilizes other protein factors for septum site selection. Noteworthy, the genome of this plant pathogen has MinCDE coding regions. The MinCD system, which operates division site selection, has been well studied in *B. subtilis* and *E. coli*, both bacteria displaying symmetrical chromosome segregation (reviewed by Lutkenhaus [2007]). We are in the process of characterizing if and how Xac coordinates chromosome segregation with cell division utilizing

MinCD. Ultimately, the filamentation observed for the Xac *parB* mutant strain could be caused by the action of a nucleoid occlusion system, analogous to the Noc/SlmA systems of *B. subtilis* and *E. coli* (Wu and Errington 2004; Bernhardt and de Boer 2005). As illustrated in Fig. 5, chromosome replication in the Xac *parB* mutant, followed by inadequate segregation, apparently produces cells with several chromosomal copies that if associated with factors able to inhibit septum assembly/closure would lead to filamentation. However, Xac does not seem to encode any Noc/SlmA-like protein that could fulfill the function of a nucleoid occlusion factor (Wu and Errington 2004; Bernhardt and de Boer 2005).

Acknowledgments

A. P. U. and P. M. M. M. received scholarships from FAPESP (2010/02041-8) and CNPq (142293/2009-1), respectively. We thank C. S. Farah for helping us with the YTH experiments and valuable discussion. This work was funded by FAPESP (Grants: 2004/09173-6; 2010/05099-7), PROPe-UNESP, and PADCF-FCF-UNESP. Beneficiário de auxílio financeiro da CAPES, Brasil.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Bartosik, A. A., J. Mierzejewska, C. M. Thomas, and G. Jagura-Burdzy. 2009. ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. *Microbiology* 155:1080–1092.
- Behlau, F., L. Amorim, J. Jr Belasque, A. Bergamin Filho, R. P. Jr Leite, J. H. Graham, et al. 2010. Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. *Plant Pathol.* 59:1031–1036.
- Belasque, J. Jr, J. C. Barbosa, A. Bergamin Filho, and C. A. Massari. 2010. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. *Trop. Plant Pathol.* 35:314–317.
- Bernhardt, T. G., and P. A. de Boer. 2005. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* 18:555–564.
- Bowman, G. R., L. R. Comolli, J. Zhu, M. Eckart, M. Koenig, K. H. Downing, et al. 2008. A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell* 134:945–955.
- Dajkovic, A., S. Pichoff, J. Lutkenhaus, and D. Wirtz. 2010. Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. *Mol. Microbiol.* 78:651–668.
- Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. Byrde, and A. H. Fielding. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.* 3:3323–3328.
- Donovan, C., A. Schwaiger, R. Kramer, and M. Bramkamp. 2010. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 192:3441–3451.
- Donovan, C., B. Sieger, R. Kramer, and M. Bramkamp. 2012. A synthetic *Escherichia coli* system identifies a conserved origin tethering factor in Actinobacteria. *Mol. Microbiol.* 84:105–116.
- Easter, J. Jr, and J. W. Gober. 2002. ParB-stimulated nucleotide exchange regulates a switch in functionally distinct ParA activities. *Mol. Cell* 10:427–434.
- Ebersbach, G., A. Briegel, G. J. Jensen, and C. Jacobs-Wagner. 2008. A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in caulobacter. *Cell* 134:956–968.
- Ferreira, H., and J. Jr Belasque. 2011. Proceedings of the international workshop on *Xanthomonas citri*/citrus canker. Ribeirão Preto, Brazil, ISBN: 978-85-64947-04-7, Available at (http://www.fcfar.unesp.br/wxc/download/workshop_Xanthomonas.pdf) UNESP/FUNDECITRUS.
- Ferreira, H., F. J. A. Barrientos, R. L. Baldini, and Y. B. Rosato. 1995. Electrotransformation in three pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:651–655.
- Fogel, M. A., and M. K. Waldor. 2006. A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.* 20:3269–3282.
- Gerdes, K., M. Howard, and F. Szardenings. 2010. Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* 141:927–942.
- Ginda, K., M. Bezulska, M. Ziolkiewicz, J. Dziadek, J. Zakrzewska-Czerwinska, and D. Jakimowicz. 2013. ParA of *Mycobacterium smegmatis* co-ordinates chromosome segregation with the cell cycle and interacts with the polar growth determinant DivIVA. *Mol. Microbiol.* 87:998–1012.
- Glaser, P., M. E. Sharpe, B. Raether, M. Perego, K. Ohlsen, and J. Errington. 1997. Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes Dev.* 11:1160–1168.
- Gottwald, T. R., J. H. Graham, and T. S. Schubert. 2002. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Online Plant Health Prog.* doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Gueiros-Filho, F. J., and R. Losick. 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* 16:2544–2556.
- Ireton, K., N. W. Gunther, and A. D. Grossman. 1994. spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176:5320–5329.

- Jakimowicz, D., B. Gust, J. Zakrzewska-Czerwinska, and K. F. Chater. 2005. Developmental-stage-specific assembly of ParB complexes in *Streptomyces coelicolor* hyphae. *J. Bacteriol.* 187:3572–3580.
- Jakimowicz, D., P. Zydek, A. Kois, J. Zakrzewska-Czerwinska, and K. F. Chater. 2007. Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces* hyphae. *Mol. Microbiol.* 65:625–641.
- Kadoya, R., J. H. Baek, A. Sarker, and D. K. Chattoraj. 2011. Participation of chromosome segregation protein ParAI of *Vibrio cholerae* in chromosome replication. *J. Bacteriol.* 193:1504–1514.
- Kiebusch, D., K. A. Michie, L. O. Essen, J. Lowe, and M. Thanbichler. 2012. Localized dimerization and nucleoid binding drive gradient formation by the bacterial cell division inhibitor MipZ. *Mol. Cell* 46:245–259.
- Lasocki, K., A. A. Bartosik, J. Mierzejewska, C. M. Thomas, and G. Jagura-Burdzy. 2007. Deletion of the parA (soj) homologue in *Pseudomonas aeruginosa* causes ParB instability and affects growth rate, chromosome segregation, and motility. *J. Bacteriol.* 189:5762–5772.
- Leonard, T. A., P. J. Butler, and J. Lowe. 2004. Structural analysis of the chromosome segregation protein Spo0J from *Thermus thermophilus*. *Mol. Microbiol.* 53:419–432.
- Leonard, T. A., P. J. Butler, and J. Lowe. 2005a. Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer—a conserved biological switch. *EMBO J.* 24:270–282.
- Leonard, T. A., J. Moller-Jensen, and J. Lowe. 2005b. Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360:523–535.
- Livny, J., Y. Yamaichi, and M. K. Waldor. 2007. Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J. Bacteriol.* 189:8693–8703.
- Low, H. H., M. C. Moncrieffe, and J. Lowe. 2004. The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. *J. Mol. Biol.* 341:839–852.
- Lutkenhaus, J. 2007. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* 76:539–562.
- Maloney, E., M. Madiraju, and M. Rajagopalan. 2009. Overproduction and localization of *Mycobacterium tuberculosis* ParA and ParB proteins. *Tuberculosis* 89(Suppl. 1):S65–S69.
- Martins, P. M., I. F. Lau, M. Bacci, J. Belasque, A. M. do Amaral, S. R. Taboga, et al. 2010. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiol. Lett.* 310:76–83.
- Mierzejewska, J., and G. Jagura-Burdzy. 2012. Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid* 67:1–14.
- Mohammadi, T., G. E. Ploeger, J. Verheul, A. D. Comvalius, A. Martos, C. Alfonso, et al. 2009. The GTPase activity of *Escherichia coli* FtsZ determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA in vitro. *Biochemistry* 48:11056–11066.
- Mohl, D. A., and J. W. Gober. 1997. Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* 88:675–684.
- Murray, H., H. Ferreira, and J. Errington. 2006. The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from parS nucleation sites. *Mol. Microbiol.* 61:1352–1361.
- Narasimhan, G., C. Bu, Y. Gao, X. Wang, N. Xu, and K. Mathee. 2002. Mining protein sequences for motifs. *J. Comput. Biol.* 9:707–720.
- Ptacin, J. L., S. F. Lee, E. C. Garner, E. Toro, M. Eckart, L. R. Comolli, et al. 2010. A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* 12:791–798.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, et al. 2001. 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* 24:218–229.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schaad, N. W., E. Postnikova, G. H. Lacy, A. Sechler, I. Agarkova, P. E. Stromberg, et al. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. *nom. rev. comb. nov.*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. *nom. rev. comb. nov.*, and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. *nom. rev. comb. nov.*; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. *comb. nov. nom. nov.*; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. *nom. rev.*; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:494–518.
- Schaad, N. W., E. Postnikova, G. Lacy, A. Sechler, I. Agarkova, P. E. Stromberg, et al. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:690–695.
- Schofield, W. B., H. C. Lim, and C. Jacobs-Wagner. 2010. Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *EMBO J.* 29:3068–3081.
- Schofield, G., R. Whiting, J. Errington, and H. Murray. 2011. Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its

- switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol. Microbiol.* 79:1089–1100.
- Silva, I. C., L. O. Regasini, M. S. Petronio, D. H. Silva, V. S. Bolzani, J. Jr Belasque, et al. 2013. Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *J. Bacteriol.* 195:85–94.
- da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, et al. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459–463.
- Sullivan, N. L., K. A. Marquis, and D. Z. Rudner. 2009. Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* 137:697–707.
- Thanbichler, M., and L. Shapiro. 2006a. Chromosome organization and segregation in bacteria. *J. Struct. Biol.* 156:292–303.
- Thanbichler, M., and L. Shapiro. 2006b. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126:147–162.
- Toro, E., S. H. Hong, H. H. McAdams, and L. Shapiro. 2008. *Caulobacter* requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:15435–15440.
- Wu, L. J., and J. Errington. 2004. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117:915–925.
- Yamaichi, Y., R. Bruckner, S. Ringgaard, A. Moll, D. E. Cameron, A. Briegel, et al. 2012. A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev.* 26:2348–2360.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Growth curve of the mutant *Xac parB::pAPU2*. Bacteria were cultivated for 36 h in NYG medium at 30°C and 200 rpm. Each point in the graph corresponds to an average of optical densities (OD_{600nm}) calculated from three independent experiments; vertical bars indicate standard deviation values calculated for each average. Here, we show the measurements done for mutant 3; however, mutants 1 and 2 exhibited similar growth patterns. Blue, wild-type *Xac*; red, *Xac parB::pAPU2*.

Table S1. Oligonucleotides.