



Avaliação do papel das proteínas HslU e RnK na regulação de proteínas do SSVI de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Palavras-Chave: *Xanthomonas citri*, *Dictyostelium discoideum*, SSVI

Autores/as:

Gabriel Caio Kokkonias e Castro – Universidade Estadual de Campinas
Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez-Martinez (orientadora) – Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO:

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*), e causa lesões circulares em folhas, ramos e frutos de cítricos, além de desfolha e queda de frutos (Behlau e Belasque, 2014). Essa doença é de particular interesse para o Brasil, maior produtor mundial de laranja (CONAB, 2017), que a controla por meio da eliminação de plantas contaminadas e pesticidas (Behlau et al., 2007). A *Xac* infecta as plantas através de aberturas no tecido, e sobrevive em vegetais mortos no solo, sendo de difícil eliminação. A espécie é uma Gammaproteobacteria aeróbica obrigatória, com um flagelo polar (Brunings e Gabriel, 2003).

A *Xac* é predada pela ameba *Dictyostelium discoideum*, que vive no solo e se alimenta por fagocitose de bactérias (Clarke, 2010; Bayer, 2018). Existem diversos mecanismos bacterianos de defesa contra esse organismo, como a secreção de substâncias que interferem com a sua viabilidade ou capacidade de realizar a fagocitose (Steinert e Heuner, 2005). As bactérias Gram-negativas utilizam sistemas de secreção para liberar proteínas para o meio externo ou células alvo, com funções diversas, como virulência e aderência (Costa et al., 2015), (Büttner e Bonas, 2010). *Xac* possui seis tipos de sistema de secreção, e o sistema de secreção do tipo 6 (SSVI) é responsável pela resistência à predação pela ameba. A regulação da expressão do SSVI é mediada pelo fator sigma alternativo de função extracitoplasmática EcfK (Bayer-Santos, 2018).

EcfK regula indiretamente o SSVI, através da regulação positiva do fator transcricional TagK, que regula os genes do SSVI. De acordo com dados do grupo de pesquisa, linhagens de *Xac* superexpressando EcfK apresentam aumento do mRNA dos genes codificadores de proteínas do SSVI, mas não dos níveis das proteínas. Já em linhagens que superexpressam TagK, tanto os níveis de mRNA quanto de proteínas são aumentados. Esses dados sugerem que algum outro gene do *regulon* de EcfK interfere com o acúmulo de proteínas do SSVI (Lima & de Santana, manuscrito em preparação).

Além de TagK, EcfK regula positivamente outros genes, incluindo *rnk*, que codifica uma proteína que interage com a RNA polimerase, e *hslU*, que codifica uma “unfoldase” que forma um proteossomo com HslV (Sundar et al., 2012). É possível que o aumento de HslU cause a degradação das proteínas do SSVI (Figura 1). Já o gene *rnk*, *regulator of nucleoside kinase*, não tem suas funções bem estabelecidas na literatura, mas tem semelhança com fatores Gre e anti-Gre (Valerie et al, 2008), com domínios de interação com RNA

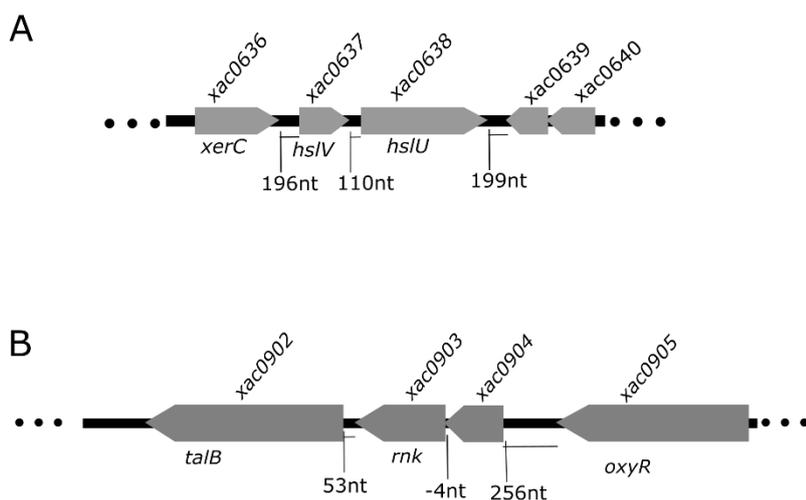


Figura 1 – Contexto genômico dos genes *hslU* e *rnk* em *Xac*.

METODOLOGIA:

Construção de linhagens mutantes com deleção em fase - Para obtenção de linhagens com deleção em fase dos genes de interesse, foi utilizado o vetor plasmidial pNPTS138, que não se replica em *Xac* e confere resistência à canamicina, além do gene *sacB*, que confere sensibilidade à sacarose. Serão obtidas construções carregando insertos com deleções dos genes, criados a partir de PCR (Figura 2, Tabela 1), de maneira a manter as regiões adjacentes à cada gene, assim como uma pequena parte de suas regiões codificadoras. Além disto, os insertos terão regiões de homologia que possibilitam a fusão com o plasmídeo por protocolo In-Fusion (Takara Bio Inc, 2016), que une os insertos e vetor por complementaridade (Figura 3).

Primer	Seq 5'-3'
GC-hslU-F1	g cg t cacggccgaagctag ct ggccat ac gg t catgaag
GC-hslU-R1	g gc g gtatcgatattag gc attag g
GC-hslU-F2	a tc ct aatatcgata cc gccGGTGAGCTGGTACAGGAT
GC-hslU-R2	G T A A T AC G ACT C ACT A GT G G G CC C T C ACT C CG A T T ACC
GC-rnk-F1	G CG T CAC G CG C GAAG C T A G C CT G T C G C AG C T G T T CAAG G A T
GC-rnk-R1	A AG G T C G C GG C T G G A T C
GC-rnk-F2	g ta t ccag cc g ac ct ta ctg cc gtg cag ca a
GC-rnk-R2	G T A A T AC G ACT C ACT A GT G G G CC C T T GAAG A T C AG C G T CAG G T T G C

Tabela 1 – Primers utilizados para PCR. Sequências em azul são homólogas com os genes de interesse, e em vermelho, com o vetor. Nucleotídeos sublinhados denotam homologia com outro primer.

As linhagens mutantes de *X. citri* serão obtidas através de um processo de dupla recombinação: durante a transformação por eletroporação, pode ocorrer uma recombinação homóloga entre as regiões flanqueadoras dos genes no vetor e no genoma, resultando na integração de todo o inserto. Como o plasmídeo não se replica em *Xac*, colônias selecionadas por resistência à canamicina e sensibilidade à sacarose contêm o inserto integrado. Já a segunda recombinação resulta na perda do plasmídeo e uma das cópias do gene, podendo as colônias que a sofreram serem selecionadas em meio com sacarose, e por sensibilidade a canamicina. Para a confirmação de ambos os eventos de recombinação e identificação da manutenção das cópias selvagem ou mutante, será realizado PCR.

polimerase. Dadas estas características, *hslU* e *rnk* estão possivelmente relacionados à regulação pós-transcricional do SSVI.

Este projeto tem como objetivo determinar se os genes *hslU* e *rnk* interferem com o acúmulo de proteínas do SSVI de *Xac*, e se eles são relevantes para a defesa da bactéria contra *D. discoideum*. O projeto foi iniciado em fevereiro de 2021, e está em andamento em carga horária presencial reduzida, devido à pandemia da COVID-19.

Análise de extrato celular por western blot – Linhagens com as deleções em fase descritas serão transformadas com o vetor para super-expressão da versão constitutivamente ativa de *ecfK*, *ecfK^{TS1E}*, sob controle de promotor regulado por arabinose. As linhagens serão cultivadas em meio contendo arabinose, de forma a induzir expressão de *ecfK^{TS1E}*. Após 2 horas de indução, as bactérias serão coletadas e lisadas, e será feita eletroforese em gel de poliácridamida para separar proteínas por seu tamanho, e as proteínas serão transferidas para membranas de nitrocelulose, possibilitando detecção por anticorpos específicos contra Hcp e VrgG, proteínas do SSVI. Desta forma, será possível perceber interferências dos genes de interesse na regulação pós-transcricional do *regulon* de EcfK.

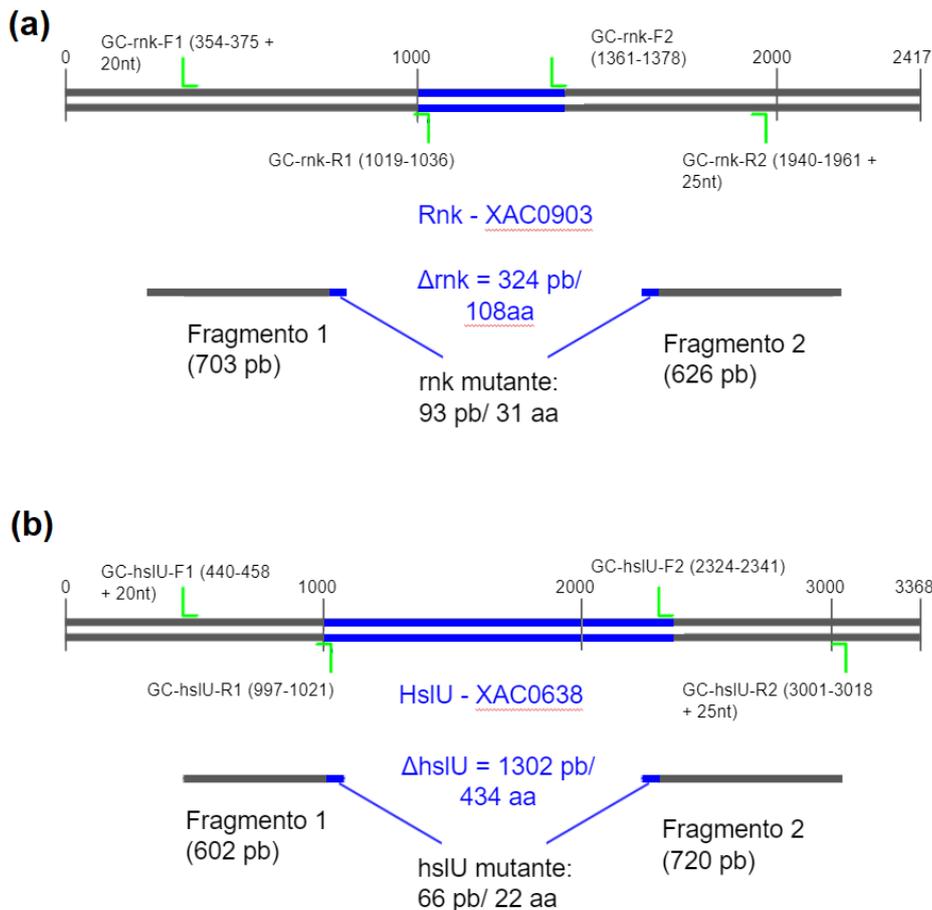


Figura 2 – Estratégia para criação de insertos para deleção em fase dos genes. Em verde, estão representados os *primers*, e em azul, os genes a serem deletados. **A** – Esquema de *rnk*; **B** – Esquema de *hslU*.

Ensaio de fagocitose – Os ensaios de placa de fagocitose serão feitos em placa de 24 poços contendo SM ágar com tapete de bactéria, no qual são adicionadas diferentes concentrações de células de *D. discoideum*, e incubadas por 6 dias a 22°C. Dessa forma, será possível analisar a importância de HslU e RnK na resistência à predação.

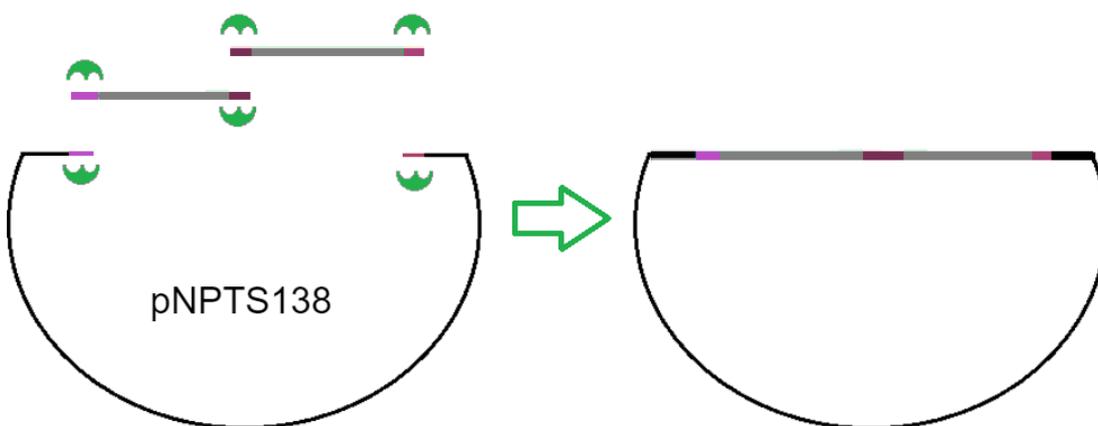


Figura 3 – Esquema de funcionamento da enzima In-Fusion, representada em verde. Em tons de roxo, as regiões homólogas.

RESULTADOS:

Construção de insertos para deleção em fase – Para obter os insertos necessários à confecção das construções com deleção em fase, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* descritos na tabela 1, resultando em 4 amplificons, correspondentes às regiões flangeadoras de cada gene de interesse, e uma pequena porção dos genes. Após purificação dos fragmentos, foi feita uma eletroforese com gel de agarose para identificar cada amplificon (Figura 4). Devido ao mecanismo de funcionamento da enzima In-Fusion, não há necessidade de realizar segunda PCR para unir os dois fragmentos correspondentes aos flancos de cada gene, que serão ligados diretamente no vetor pNPTS (Figura 3).

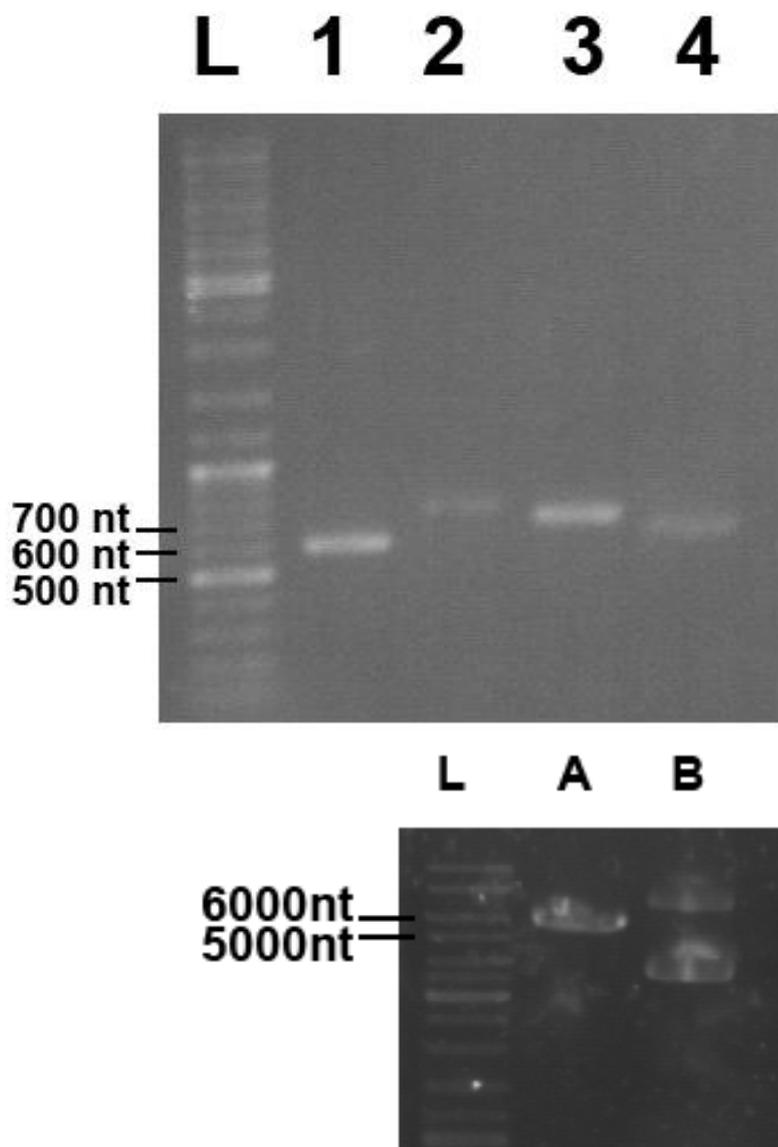


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de PCR, amplificados de regiões imediatamente a montante e a jusante de cada gene. 1 – Região a montante de *hslU* (fragmento 1 *hslU*); 2 – Região a jusante de *hslU* (fragmento 2 *hslU*); 3 – Região a montante de *rnK* (fragmento 1 *rnK*); 4 – Região a jusante de *rnK* (fragmento 2 *rnK*); L – Marcador molecular.

Digestão do vetor pNPTS138 –

Para a ligação do vetor com os insertos pela enzima In-Fusion, se faz necessária a linearização do plasmídeo. Desta forma, foi realizada a digestão do vetor pNPTS138 com as enzimas Nhe1 e Apa1, cujos sítios de restrição foram inclusos nos primers descritos na Tabela 1. O resultado da digestão é exibido na Figura 5.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pNPTS138. A – Vetor digerido por Apa1 e Nhe1; B – Vetor não linearizado; L – Marcador molecular.

BIBLIOGRAFIA

Alm, Eric J et al. “The MicrobesOnline Web site for comparative genomics.” *Genome research* vol. 15,7 (2005): 1015-22. doi:10.1101/gr.3844805

Bayer-Santos, E., Lima, L. dos P., Ceseti, L. de M., Ratagami, C. Y., de Santana, E. S., da Silva, A. M., ... Alvarez-Martinez, C. E. (2018). *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1562–1575. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14085>

- Behlau, F., & Belasque Júnior, J. (2014). *Cancro cítrico: a doença e seu controle*. Araraquara: Fundecitrus.
- BEHLAU, Franklin et al. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 311-317, Aug. 2007. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582007000400005&lng=en&nrm=iso>. access on 08 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000400005>
- Brunings, A.M. and Gabriel, D.W. (2003), *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4: 141-157. doi:[10.1046/j.1364-3703.2003.00163.x](https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00163.x)
- CONAB (2017), Laranja - Análise Mensal - Fevereiro/2017, <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-laranja>
- Costa, T., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 13, 343–359 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>
- Clarke, M. (2010), Recent insights into host–pathogen interactions from *Dictyostelium*. *Cellular Microbiology*, 12: 283-291. doi:[10.1111/j.1462-5822.2009.01413.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01413.x)
- da Silva, A., Ferro, J., Reinach, F. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417, 459–463 (2002). <https://doi.org/10.1038/417459a>
- Froquet, R. et al., 2009. *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nature protocols*, 4(1), pp.25–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131953>
- Korber, P., Stahl, J.M., Nierhaus, K.H. and Bardwell, J.C. (2000), Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *The EMBO Journal*, 19: 741-748. doi:[10.1093/emboj/19.4.741](https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.741)
- Lamour, Valerie et al. Crystal structure of *Escherichia coli* Rnk, a new RNA polymerase-interacting protein. **Journal of molecular biology** vol. 383,2 (2008): 367-79.
- LIMA, Lidia dos Passos. Caracterização de fator sigma de função extracitoplasmática SigF de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2017. 1 recurso online (99 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/322344>. Acesso em: 23 abr. 2020
- M.M.S.M. Wösten, Eubacterial sigma-factors, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 22, Issue 3, September 1998, Pages 127–150, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00364.x>
- Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429–434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- Murali D. Bashyam, Seyed E. Hasnain, The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis, *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 4, Issue 4, 2004, Pages 301-308, ISSN 1567-1348, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.04.003>.
- Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C. 1991. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol* 173:4254–4262.
- Steinert, M. and Heuner, K. (2005), *Dictyostelium* as host model for pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 7: 307-314. doi:[10.1111/j.1462-5822.2005.00493.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00493.x)
- Sundar, S., Baker, T.A. and Sauer, R.T. (2012), The I domain of the AAA+ HslUV protease coordinates substrate binding, ATP hydrolysis, and protein degradation. *Protein Science*, 21: 188-198. doi:[10.1002/pro.2001](https://doi.org/10.1002/pro.2001)
- Takara Bio USA Inc. (2016), In-Fusion® HD Cloning Kit
- Woods EC, McBride SM. Regulation of antimicrobial resistance by extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Microbes Infect*. 2017;19(4-5):238–248. doi:[10.1016/j.micinf.2017.01.007](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.01.007)
- Xue Dong, Chen Yun, Li Jiang, Han Jiahui, Liu Yingying, Jiang Shijie, Zhou Zhengfu, Zhang Wei, Chen Ming, Lin Min, Ongena Marc, Wang Jin; Targeting Hsp20 Using the Novel Small Non-coding RNA DnrH Regulates Heat Tolerance in *Deinococcus radiodurans*; *Frontiers in Microbiology*, Volume 10, 2019; <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02354>; DOI= 10.3389/fmicb.2019.02354