Regulação do Sistema de Secreção do Tipo VI (SS6) de *Xanthomonas citri* pela proteína quinase PknS

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

Autores/as:
Enzo Breviglieri Sichi de Mello – Universidade Estadual de Campinas
Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez-Martinez (orientadora) – Universidade Estadual de Campinas

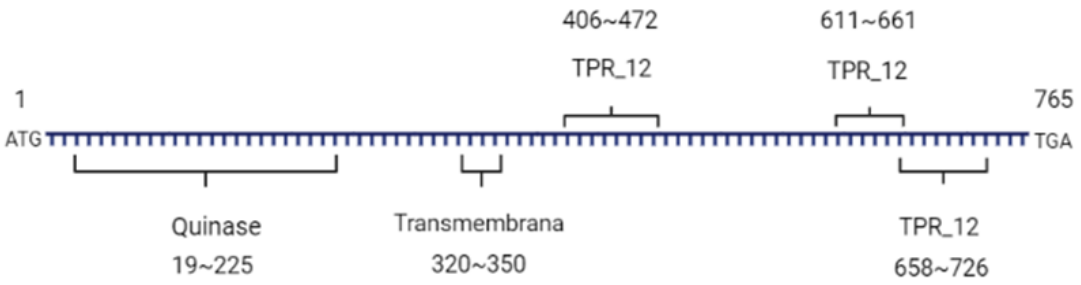
Introdução:

A bactéria *Xanthomonas citri* (Xac) é o fitopatógeno causador do cancro cítrico, uma doença que impacta fortemente a produtividade de plantas cítricas. Isso gera grandes perdas econômicas para vários países e apresenta um impacto particular no Brasil, que é um dos principais exportadores de laranja e suco de laranja do mundo (USDA, https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf, Janeiro de 2021). A Xac pode sobreviver como epífita sobre as superfícies das folhas sem causar sintomas, até que tenha acesso ao parênquima mesófilo de plantas suscetíveis, seja pelas aberturas dos estômatos ou por lesões foliares. Uma vez no mesofilo, a bactéria desenvolve sua patogenicidade: são formadas lesões, e eventualmente erupções que facilitam a transmissão da Xac para novas plantas através da chuva e do vento (Brunings & Gabriel, 2003).

A Xac é predada pela ameba *Dictyostelium discoideum*, que vive no solo e em superfícies foliares, se alimentando de bactérias por fagocitose. Um dos mecanismos de defesa implementados pela Xac contra a predação por eucariotos é o uso de Sistemas de Secreção, que são complexos proteicos macromoleculares responsáveis pela descarga de efetores no ambiente ou no citoplasma de outras células. Os efetores podem ter diversas funções, como aderência ou citotoxicidade.

Foi demonstrado que a expressão dos componentes do Sistema de Secreção do Tipo 6 (SS6) de Xac é afetada positivamente quando um fator-σ da família extracitoplasmática (σ^{ECF}) - o fator-σ EcfK - é ativo constitutivamente. Diferentemente de outros fatores σ, EcfK é regulado por fosforilação direta, através da ação da proteína quinase PknS. Desta forma, a ativação da quinase PknS possui, possivelmente, um efeito indutivo indireto sobre a expressão dos componentes do SS6, através da fosforilação do fator σ EcfK.

A via de sinalização que promove a ativação de EcfK através da fosforilação por PknS ainda não é plenamente compreendida. Análises *in silico* de PknS mostram que a proteína possui um domínio quinase amino-terminal e uma região transmembrana, além de uma porção possivelmente periplasmática contendo dois domínios do tipo tetratricopeptídeo (TPR) - motivos estruturais responsáveis por mediar interações entre proteínas.



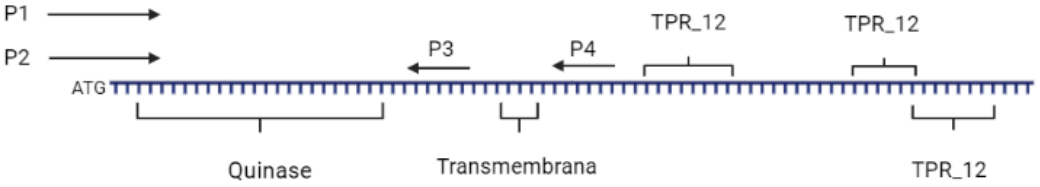
Este trabalho busca iluminar a via de sinalização que leva ao funcionamento da PknS, através da melhor caracterização das funções de seus diferentes domínios. O conhecimento aqui produzido pode ter aplicações na produção de tecnologias que desabilitem a expressão e ativação do SS6 em Xac, reduzindo o impacto do cancro cítrico em plantações e as perdas econômicas dos produtores de laranjas e outras plantas cítricas.

Especificamente, este trabalho visa avaliar se a atividade quinase da região citoplasmática de PknS é modulada pela localização transmembrana da proteína e por seu domínio periplasmático.

Metodologia

1. Obtenção das linhagens expressando PknS truncada

Os primers se alinham com o gene codificante da quinase PknS da seguinte forma:



P1: Forward, Nhe1, FLAG
P2: Forward, Nhe1
P3: Reverse, Sal1
P4: Reverse, Sal1

Created in BioRender.com bio

Os produtos de amplificação do gene truncado foram clonados em um plasmídeo pBRA (que confere resistência a estreptomicina e é capaz de replicar em *Escherichia.coli* e Xac), sob controle de promotor induzível por arabinose. A clonagem em *E.coli* se deu através da digestão com enzimas de restrição do vetor e dos amplicons, seguida de uma

reação de ligação e seleção por estreptomicina. Os vetores foram extraídos de *E.coli* e transformados em uma linhagem ΔpknS através de eletroporação. Dois clones foram usados em experimentos subsequentes: P1+P3; P1+P4. O primer P1 gera clones com o epítopo FLAG na região N-terminal.

2. Análise de extrato celular através de Western Blot

Inóculos das linhagens complementadas com a proteína truncada foram normalizados à D.O 500nm = 0.1. Durante a fase log de crescimento, foi adicionada arabinose (0.3% do volume total do inóculo). Nos períodos de 30 min e 2 horas após a indução, foi retirado o extrato celular de proteínas de cada um dos inóculos, para que eles fossem utilizados em experimentos de Western Blot.

3. RT PCR

A partir da indução por adição de arabinose/repressão por adição de glicose, também foi extraído o RNAm total das amostras após 30 minutos. As amostras foram salvas em trizol e guardadas a -80ºC para serem utilizadas em experimentos de quantificação através de rt-qPCR. Será medida a expressão de três genes codificantes de proteínas estruturais do SS6.

4. Ensaios de fagocitose

Serão realizados ensaios já padronizados no laboratório para verificar o fenótipo da sobrevivência das bactérias testadas contra predação por *D. discoideum*.

Resultados

1. Obtenção dos clones

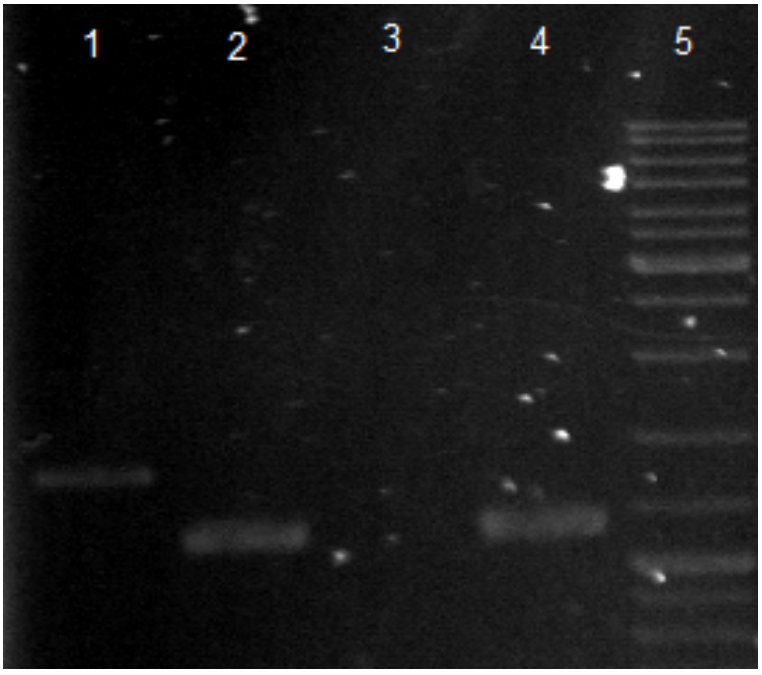


Figura 1: Resultados das amplificações com cada par de primers. O produto de P1+P4 foi amplificado posteriormente, sendo utilizado na formação de um dos clones.

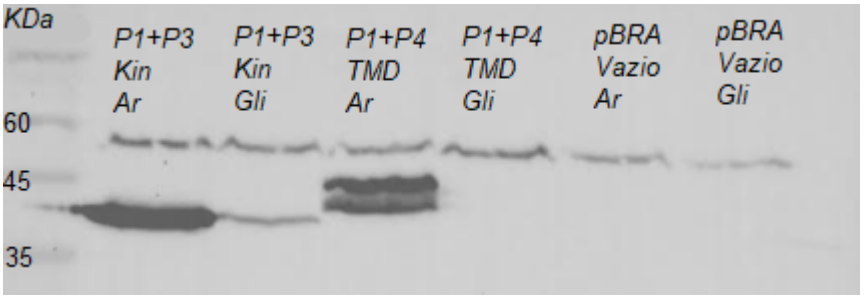
1- P2+P4 = 1294bp;
2- P2+P3 = 1159bp;
3- P1+P4 (não amplificado) = 1319bp. "TMD";
4- P1+P3 = 1184bp. "Kin";
5- Marcador GeneRuler DNA ladder 1kb Thermo Scientific

Os produtos das amplificações que utilizaram o primer P1 (forward, peptídeo FLAG) foram inseridos no plasmídeo pBRA, e o inserto foi clonado em XacΔ*pknS* através de eletroporação. Assim, foram geradas linhagens de Xac que expressam:
1- PknS truncada imediatamente a montante da região transmembrana (Kin)
2- PknS truncada imediatamente a montante da região TPR (TMD)

Ambas as linhagens expressam a proteína fusionada ao epítopo FLAG (DYKDDDDK).

2. Análise de extrato celular dos clones

Extratos proteicos foram obtidos de culturas das linhagens contendo cada uma das construções, após 2 horas de indução com arabinose ou cultivadas na presença de glicose. A presença das diferentes versões de PknS foi analisada por imunoblot, usando anticorpo Anti-FLAG.



As proteínas aparentam ter o tamanho esperado: Kin=40.85 kDa; TMD=49.9 kDa. Uma banda inespecífica do extrato protéico de Xac é detectável pelo anticorpo que se liga ao epítopo FLAG, e pesa em torno de 60 kDa.

Em seguida, os extratos foram marcados em uma mesma membrana com os anticorpos anti-FLAG e anti-Phospho Thr (marcador de resíduos fosforilados), de forma a verificar se as proteínas se encontram fosforiladas *in vivo*. Resultados preliminares mostram que as proteínas modificadas são fosforiladas nestas condições. No modelo atual de funcionamento da PknS, o sinal extracitoplasmático da presença da ameba permite que a proteína seja autofosforilada e ativada.

Serão feitos novos experimentos de imunoblot para confirmar estes resultados, bem como experimentos para verificar a presença de proteínas componentes do SS6 em cada condição. Também foram e serão feitos experimentos de imunoblot utilizando os extratos com tempo de indução de 30 minutos.

Perspectivas

Ainda estão sendo produzidos dados para este projeto. No momento, o trabalho é focado na análise dos extratos de proteína obtidos a partir dos clones. Nos últimos meses da duração, será analisada a expressão de genes componentes do SS6 através de qRT-PCR. Além disso, serão realizados ensaios de fagocitose com *D.discoideum*, de forma a verificar a sobrevivência das linhagens obtidas contra a predação pela ameba.

Bibliografia

- Bayer-Santos et al., 2018. ***Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase**. Special Issue on Pathogen and Antibiotic Resistance Ecology, 20 (4), pp. 1562 - 1575
- Alain Filloux, 2013. **The rise of the Type VI secretion system**. https://doi.org/10.12703/P5-52
- USDA, 2021: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf
- Brunings, A.M. & Gabriel, D.W., 2003. **Xanthomonas citri: Breaking the surface. Molecular Plant Pathology**, 4(3), pp.141–157.
- Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K. *et al.* **Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana***. *ISME J* 3, 675–684 (2009). https://doi.org/10.1038/ismej.2009.11
- Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** Methods 25(4):402-8. (2001) doi: 10.1006/meth.2001.1262.