



XXXI Congresso de Iniciação Científica ----- Unicamp

2
0
2
3



UNICAMP



PRP
pós-graduação de pesquisa
unicamp

Avaliação do efeito antibacteriano e anti eucariótico de proteína associada ao Sistema de Secreção do tipo VI de *Xanthomonas citri*

Palavras-Chave: *Xanthomonas citri*, Sistema de secreção VI, Efetor

Autores:

Enzo Breviglieri Sichi de Mello – Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez-Martinez (orientadora) – Universidade Estadual de Campinas

Introdução

Xanthomonas citri (*X. citri*) é uma bactéria gram-negativa fitopatogênica que infecta plantas cítricas e gera prejuízo em sua produção. A predação de bactérias por amebas na superfície de folhas pode reduzir as chances de infecção da planta e disseminação de fitopatógenos no ambiente. *X. citri* possui um sistema de secreção do tipo VI (SS6) que transporta proteínas efetoras necessárias para a resistência à predação pela ameba do solo *Dictyostelium discoideum*. Os componentes estruturais do SS6 são co-expressos com as proteínas efetoras por ele liberadas, que podem ser tóxicas para eucariotos, procariotos ou ambos.

Através do estudo do *cluster* onde estão localizados os genes que codificam componentes do SS6, foram identificados quatro genes candidatos a efetores desse sistema. Ao observar as predições *in silico* para um desses genes - *xac 4136* - é possível identificar motivos estruturais que indicam provável interação com eucariotos e procariotos.

O domínio previsto RBL (do inglês - “rhamnose binding lectin” - lectina de ligação à ramnose) indica possível interação com açúcares ligados à parede de bactérias. A proteína hisactofilina, que possui identidade com uma porção de *xac4136*, é expressa pela ameba *D. discoideum*, e possui função de remodelamento de actina em condições ácidas. Além disso, são previstos domínios transmembrana na proteína *xac4136*, o que é comum em proteínas efetoras de sistemas de secreção que tem como alvo outras células.

Baseado nas previsões sobre a estrutura da proteína codificada pelo gene *xac4136* e em sua posição no genoma de *X. citri*, formou-se a hipótese de que ele codifica uma proteína efetora do SS6. Este trabalho visa testar essa hipótese através de ensaios de toxicidade em bactérias e leveduras.

Objetivos

Este trabalho visa caracterizar *xac4136* como um possível efetor do SS6 em *X. citri* através da avaliação de sua toxicidade em *E. coli*, *X. citri*, e *Saccharomyces cerevisiae*. Para isto, foram realizados ensaios de crescimento das linhagens selecionadas em condições de superexpressão ou repressão do gene *xac4136* clonado em vetores indutíveis.

Materiais e Métodos

1. Obtenção das linhagens de bactérias

Para a análise do efeito citotóxico do gene *xac4136* em bactérias, serão necessárias linhagens de *Xac* e *E. coli* que expressem o gene de forma induzível. Uma linhagem de *Xac* que possui o plasmídeo pBRA (que possui um promotor induzível por arabinose e inibido por glicose) contendo o gene *xac4136* fusionado à sequência que codifica o epítipo FLAG (DYKDDDDK) já foi produzida no laboratório. Esta linhagem foi usada nos ensaios fenotípicos realizados em *Xac*. A construção usada para expressão em *E. coli* foi obtida durante o projeto, pela clonagem a partir do vetor pBRA com inserto de *xac4136* já presente no laboratório, e que possui o epítipo FLAG na região N-terminal. O plasmídeo foi extraído com o kit GeneJet Plasmid Miniprep da empresa ThermoFisher, e digerido com as enzimas NcoI e Sall. As mesmas enzimas foram usadas para digerir o plasmídeo pBAD24, que permite expressão induzida do inserto clonado por adição de arabinose ou repressão da expressão por adição de glicose (L M Guzman et al., 1995). O inserto extraído foi ligado ao plasmídeo em uma reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase. O plasmídeo resultante foi clonado em *E.coli* MG1655.

2. Verificação da toxicidade de *xac4136* em bactérias

Foi utilizada uma linhagem selvagem de *X. citri* com o plasmídeo pBRA contendo o gene *xac4136* fusionado ao epítipo FLAG. A expressão foi induzida a partir do tempo 0 pela adição de arabinose (concentração final de 0,3%) ao meio. Foram feitos controles com a repressão da expressão através da adição de glicose (concentração final de 0,3%) ao meio. Foi coletada a densidade óptica (D.O) das amostras a cada duas horas. Também

foram feitos experimentos de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em *X. citri*, sendo os dados coletados nos mesmos tempos que a medida da D.O.

O mesmo experimento foi realizado com a linhagem MG1655 de *E. coli*, utilizando o vetor pBAD24 para expressão controlada do gene *xac4136*. Foram coletados apenas dados da D.O.

3. Clonagem no vetor pET22-b

Para verificar se a toxicidade de *xac4136* é dependente de sua localização no periplasma, foi gerada uma linhagem de *E. coli* BL21 contendo o vetor pET22-b, capaz de expressar o gene *xac4136* fusionado ao peptídeo sinal pelB, que direciona proteínas ao periplasma em bactérias. O plasmídeo vazio, presente no laboratório, foi digerido pelas enzimas NcoI e Sall, e ligado ao inserto do gene *xac4136* extraído do plasmídeo pBRA por digestão com as mesmas enzimas. A ligação do inserto ao vetor foi feita com a enzima T4 DNA Ligase, e o plasmídeo resultante foi clonado em *E. coli* BL21 para permitir a expressão induzida pela adição de IPTG.

4. Imunoblot

Para confirmar a expressão da proteína em condições indutoras, amostras de lisado total de proteínas das bactérias foram analisadas por imunoblot, usando o anticorpo anti-FLAG.

Resultados

1. Expressão de *xac4136* em *X. citri* com vetor pBRA

Foi possível observar a partir da densidade óptica das amostras de *X. citri* que a superexpressão do gene *xac4136* impede o crescimento das culturas de 0 a 24 horas após a indução. A partir dos experimentos de contagem de unidades formadoras de colônia, foi possível observar que houve efeito bacteriostático nos tempos de 0 a 8 horas. Em tempos prolongados, apenas no ponto de 24 horas, foi possível observar a morte das células.

2. Expressão de *xac4136* em *E. coli* MG1655 com vetor pBAD24

É possível verificar que a superexpressão de *xac4136* em *E. coli* a partir do vetor pBAD24 não impacta seu crescimento. A densidade óptica medida nas amostras que superexpressam o gene foi igual àquela medida nos controles.

Resultados preliminares

1. Expressão de *xac4136* em *E. coli* BL21 com vetor pET22-b

Curiosamente, a superexpressão de *xac4136* fusionado ao peptídeo sinal pelB apresentou um efeito de toxicidade similar ao observado em *X. citri*. Estes resultados ainda não foram confirmados em triplicata biológica.

Conclusões

A superexpressão do gene é tóxica e possui efeito bacteriostático em *X. citri*. Após um tempo longo de expressão (medido em 24h), é possível observar a morte das células, como validado pelos experimentos de contagem de unidades formadoras de colônia.

A superexpressão do gene em *E. coli* MG1655 não aparenta ser tóxica às bactérias. Entretanto, a expressão do gene quando fusionado ao peptídeo sinal pelB, expresso em *E. coli* BL21, apresenta toxicidade similar ao que foi observado nos experimentos com *X. citri*. A partir dessas observações, foi formada a hipótese de que a toxicidade da proteína ocorre no periplasma das bactérias, e depende de direcionamento até esta região para se manifestar. Entretanto, ainda são necessários mais experimentos para confirmar esta hipótese.

Perspectivas

Será feita a clonagem do gene *xac4136* em levedura através do sistema de clonagem modular MoClo, e serão feitos experimentos para verificar sua toxicidade durante a superexpressão. Também serão realizados ensaios para avaliar a viabilidade das bactérias em condições de superexpressão do gene através do kit *LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy & quantitative assays*, da empresa *ThermoFisher Scientific*, de forma a corroborar e complementar os resultados obtidos.

Referências

- Monjarás Fera, J., & Valvano, M. A. (2020). An Overview of Anti-Eukaryotic T6SS Effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.584751>
- Jurénaš, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- TATENO, H., OGAWA, T., MURAMOTO, K., KAMIYA, H., & SANEYOSHI, M. (2002). Rhamnose-binding Lectins from Steelhead Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eggs Recognize Bacterial Lipopolysaccharides and Lipoteichoic Acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(3), 604–612. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.604>
- Stoeckelhuber, M., Noegel, A. A., Eckerskorn, C., Kohler, J., Rieger, D., & Schleicher, M. (1996). Structure/function studies on the pH-dependent actin-binding protein hisactophilin in Dictyostelium mutants. *Journal of Cell Science*, 109(7), 1825–1835. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.7.1825>
- Watanabe, Y., Tateno, H., Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Hirabayashi, J., Nakamura, O., Watanabe, T., Kamiya, H., Naganuma, T., Ogawa, T., Naudé, R. J., & Muramoto, K. (2009). The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(2), 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.08.008>
- Lien, Y.-W., & Lai, E.-M. (2017). Type VI Secretion Effectors: Methodologies and Biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00254>
- Ray, A., Schwartz, N., Souza Santos, M., Zhang, J., Orth, K., & Salomon, D. (2017). Type VI secretion system MIX-effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities. *EMBO Reports*, 18(11), 1978–1990. <https://doi.org/10.15252/embr.201744226>
- Jessica E Martyn, Laura Gomez-Valero, Carmen Buchrieser, The evolution and role of eukaryotic-like domains in environmental intracellular bacteria: the battle with a eukaryotic cell, *FEMS Microbiology Reviews*, 2022;, fuac012, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac012>
- Brunings, A. M., & Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4(3), 141–157. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00163.x>
- Alvarez-Martinez CE, Sgro GG, Araujo GG, Paiva MRN, Matsuyama BY, Guzzo CR, Andrade MO, Farah CS. Secrete or perish: The role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Dec 24;19:279-302. doi: 10.1016/j.csbj.2020.12.020. PMID: 33425257; PMCID: PMC7777525.
- Dar, Yasmin et al. “The Antibacterial and Anti-Eukaryotic Type VI Secretion System MIX-Effector Repertoire in *Vibrionaceae*.” *Marine drugs* vol. 16,11 433. 4 Nov. 2018, doi:10.3390/md16110433
- Lima, L. et al. “An Extracytoplasmic Function Sigma Factor Required for Full Virulence in *Xanthomonas citri* pv. *citri*” *Journal of Bacteriology* Vol. 204, No. 5. May. 2022