



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LIDIA DOS PASSOS LIMA

CARACTERIZAÇÃO DE FATOR SIGMA DE FUNÇÃO
EXTRACITOPLASMÁTICA SigF DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

CAMPINAS

2017

LIDIA DOS PASSOS LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DE FATOR SIGMA DE FUNÇÃO
EXTRACITOPLASMÁTICA SigF DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na Área de Microbiologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LIDIA DOS PASSOS LIMA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CRISTINA ELISA ALVAREZ-MARTINEZ.

Orientador (a): CRISTINA ELISA ALVAREZ-MARTINEZ

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/19720-6

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L628c Lima, Lidia dos Passos, 1990-
Caracterização de fator sigma de função extracitoplasmática *SigF* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Lidia dos Passos Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Cristina Elisa Alvarez Martinez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fator sigma. 2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 3. Regulação da expressão gênica. 4. Proteína quinases. I. Alvarez-Martinez, Cristina Elisa, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* extracytoplasmic function sigma factor *SigF*

Palavras-chave em inglês:

Sigma factor

Xanthomonas citri subsp. *citri*

Gene expression regulation

Protein kinases

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Cristina Elisa Alvarez Martinez [Orientador]

José Freire da Silva Neto

Beny Spira

Data de defesa: 23-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 23 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez-Martinez

Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Prof. Dr. Beny Spira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmico do aluno.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de desenvolver este belo trabalho, por cada desafio encontrado e superado ao longo da jornada, por todo o aprendizado, pelas pessoas maravilhosas, alegres e divertidas com as quais trabalho e por ser o meu porto seguro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez-Martinez, pela oportunidade, pela excelente orientação, dicas, discussões científicas, por toda a paciência, dedicação e por compartilhar o seu conhecimento.

À Ana Laura Boechat Borges, pela sua gentileza, por me receber tão bem em sua casa durante a minha estadia na USP em São Paulo, por me ajudar com o preparo das bibliotecas para RNA-seq, por todo o seu conhecimento compartilhado sobre a técnica e pela sua amizade.

À Profa. Dra. Regina Lúcia Baldine, por me receber e disponibilizar o seu laboratório para preparo das amostras de RNA-seq.

Ao CEFAP – ICB/USP, pelo sequenciamento das bibliotecas de RNA-seq em seu equipamento NextSeq.

À Profa Dra. Tie Koide e seu aluno de doutorado Alan Lorenzetti (FMRP/USP), pelas análises dos dados de transcriptoma.

Ao Centro de Pesquisas SGC (Structural Genomics Consortium – Unicamp), ao Rafael Couñago, Opher Gileadi, Anita Salmazo e Priscila pela colaboração durante a etapa de expressão e purificação de proteínas.

*À Dra Ethel Bayer dos Santos e ao Prof Dr Shaker Chuck Farah (Dep. de Bioquímica-IQ/USP), pela colaboração e desenvolvimento dos trabalhos com *Dyctiostelium discodeum*.*

Aos meus colegas de laboratório, Lucas Ceseti, Camila Ratagami e Robert Bernedo, pela amizade sincera, pelos risos, pela convivência e pelas discussões científicas nas reuniões do laboratório.

Ao meu colega de laboratório Lucas Ceseti, por compartilhar seus dados de RT-PCR quantitativo.

Ao Prof. Tomomassa Yano, à Stella, ao Luiz, a Ana Lúcia e a Tamires pela amizade.

À PRP-FAEPEX pela bolsa de mestrado durante estes dois anos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto.

E, finalmente, agradeço a minha querida família, ao meu irmão Ivan, às minhas irmãs Iza e Lúgia e minha querida Mãe, pelo apoio, incentivo, carinho e amor.

RESUMO

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*Xac*) é uma bactéria Gram-negativa responsável pela doença do cancro cítrico em uma grande variedade de plantas cítricas, causando grandes perdas econômicas. *Xac* sobrevive como epífita nas superfícies foliares e causa a doença após a penetração e crescimento dentro do parênquima mesofílico de plantas suscetíveis. Como uma bactéria associada a plantas, *Xac* precisa se adaptar às condições ambientais em constante mudança. Fatores sigma alternativos da família extracitoplásmica (ECF) estão envolvidos na regulação da expressão gênica em resposta ao estresse ambiental. O genoma de *Xac*306 codifica 9 fatores sigmas ECF, o que provavelmente reflete seu estilo de vida e sugere um papel importante desta família de reguladores transcricionais na adaptação de *Xac*. O objetivo deste estudo é caracterizar a função de um fator sigma ECF encontrado no genoma de *Xac*, denominado *sigF*. Para isso, foram obtidas duas linhagens com níveis alterados de *sigF*: uma linhagem mutante ($\Delta sigF$) por deleção em fase do gene e uma linhagem com cópia extra do gene em vetor multicópia, o que promove a super-expressão deste sigma. Ensaio de virulência em hospedeiro suscetível demonstraram que *sigF* não é necessário para a virulência em *Xac*. A sensibilidade da linhagem $\Delta sigF$ a diferentes tipos de estresse ambiental também foi analisada, incluindo estresse oxidativo, por radiação UV, deficiência de ferro e tratamento com o agente quelante de metais ácido fítico, não sendo observadas diferenças na viabilidade quando comparada com a linhagem selvagem. Além disso, as linhagens com níveis alterados de *sigF* não apresentaram alterações na capacidade de formar biofilmes e aderir às folhas da planta. Curiosamente, observamos que SigF é essencial para a sobrevivência de *Xac* a predação pela ameba de vida livre *Dictyostelium discoideum*. Resultados de ensaios de RT-PCR quantitativo e RNA-Seq demonstram que a super-expressão de uma versão que mimetiza um estado fosforilado de SigF causa indução da expressão de genes que codificam componentes de um sistema de secreção do tipo VI (SSVI) de *Xac*, que também tem papel essencial na sobrevivência a *D. discoideum*. Ensaio preliminares de fosforilação *in vitro* pela incubação de SigF purificada com a proteína quinase PknB, codificada por um gene localizado em provável operon com *sigF*, reforçam o modelo proposto, no qual SigF é regulado em nível pós-traducional por fosforilação. Além disto, nossos resultados demonstram que SigF regula positivamente a expressão do SSVI de *Xac*.

ABSTRACT

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*Xac*) is a Gram-negative bacterium responsible for citrus canker disease in a wide variety of citrus plants, causing major economic losses. *Xac* survives as epiphyte on leaf surfaces and causes the disease after penetration and growth inside mesophyll parenchyma of susceptible plants. As a plant-associated bacterium, *Xac* needs to adapt to constantly changing environmental conditions. Alternative sigma factors of the extracytoplasmic family (ECF) are involved in the regulation of gene expression in response to environmental stress. The genome of *Xac* strain 306 encodes 9 sigma factors of the ECF family, which probably reflects its lifestyle and suggests an important role of this family of transcriptional regulators in *Xac* adaptation. The aim of this study is to characterize the function of one ECF sigma factor found in *Xac* genome, named *sigF*. For that, we have constructed a *sigF* mutant strain ($\Delta sigF$) by in frame deletion of the gene and an overexpression strain, which contains an extra copy of *sigF* in a multicopy plasmid. Results from virulence assays in a susceptible host have shown that *sigF* is not required for *Xac* virulence. We've also tested sensitivity of the $\Delta sigF$ strain to distinct types of environmental stress, including oxidative stress, UV radiation, iron deprivation and treatment with the metal chelating agent phytic acid and no difference in viability was observed when compared to the wild type strain, indicating the SigF is not required under these conditions. In addition, we have not observed differences in biofilm formation and adhesion to plant leaves caused by deletion or overexpression of *sigF*. Interestingly, our results show that SigF is required for *Xac* survival to predation by the amoeba *Dictiostelium discoideum*. In addition, results from qRT-PCR analysis and RNA-seq experiments have shown that overexpression of a SigF phospho-mimicking mutant version promotes induction of genes from a *Xac* type VI secretion system required for survival to *D. discoideum*. Preliminary *in vitro* phosphorylation assays using purified SigF and PknB Ser/thr kinase encoded in the same operon as *sigF* corroborates with a model in which SigF is post-translational regulated by phosphorylation. Our results also suggest that SigF positively regulates *Xac* SSVI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de infecção e sintomas típicos do cancro cítrico.	14
Figura 2. Promotor típico de fator sigma primário.	16
Figura 3. Domínios dos fatores sigma da família σ^{70} e suas funções e sub-regiões.	16
Figura 4. Etapas do Início de Transcrição.	18
Figura 5. Domínios apresentados pelos diferentes grupos de fatores sigmas da família σ^{70}	20
Figura 6. Comparação das interações entre o domínio σ_2 dos fatores sigma dos grupos 1 e 4 com suas regiões promotoras -10 correspondentes.	22
Figura 7. Regulação de Fator Sigma ECF por Proteólise.	24
Figura 8. Diversidade de mecanismos para regulação de fatores sigma ECF.	25
Figura 9. Estruturas da PknB de <i>M. tuberculosis</i> e de <i>Xac</i>	29
Figura 10. Contexto genômico de <i>xac4128</i> , ou <i>sigF</i> em <i>Xac</i>	30
Figura 11. Mapa do vetor pBRA e esquematização das ampliações dos genes <i>sigF</i> e <i>sigL</i>	47
Figura 12. Obtenção da construção pLL003.	48
Figura 13. Representação esquemática da obtenção do mutante por deleção em fase.	49
Figura 14. Segundo evento de recombinação (intramolecular).	50
Figura 15. A super-expressão de <i>xac4129</i> impede o crescimento de <i>Xac</i>	51
Figura 16. A ausência de <i>sigF</i> não afeta o crescimento de <i>Xac</i> nos meios de culturas 2xTY e XVM2.	52
Figura 17. Inibição do crescimento de <i>Xac306</i> e $\Delta sigF$ por ácido fítico.	54
Figura 18. Crescimento de <i>Xac306</i> e $\Delta sigF$ em carência nutricional de ferro.	55
Figura 19. Estudo do Papel de σ^F Interação com Plantas Hospedeiras.	56
Figura 20. Aderência e formação de biofilme de $\Delta sigF$ e <i>sigF⁺⁺</i>	57
Figura 21. A expressão de <i>sigF</i> é induzida no crescimento epifítico e não sofre alterações em resposta ao crescimento no interior de tecido foliar de plantas hospedeiras.	58
Figura 22. SigF não é essencial para a resposta a estresses por UVC e H ₂ O ₂	59
Figura 23. SigF e SSVI são necessários para resistência a predação por <i>D. discodeium</i>	61
Figura 24. Análise da Expressão Relativa de <i>sigF</i> e <i>sigL</i> pela presença de cópia extra no vetor pBRA e em resposta ao indutor arabinose.	63
Figura 25. Expressão relativa de genes do SSVI nas linhagens $\Delta sigF$ e <i>sigF⁺⁺</i>	64
Figura 26. Análise da sequência de proteína codificada por <i>xac4128</i> pela ferramenta ECF Finder.	65
Figura 27. Alinhamento Múltiplo de sequências de fatores sigmas do grupo ECF 43.	66
Figura 28. Expressão relativa de genes do SSVI nas linhagens que mimetizam estado fosforilado de σ^F	67
Figura 29. Expressão relativa de <i>PAAR_{xac4126}</i> e <i>pknB_{xac4127}</i> em <i>sigF⁺⁺T51E</i>	68
Figura 30. Análise da Complementação do Fenótipo de $\Delta sigF$ pelas versões com mutação T7E a T163E.	69
Figura 31. Expressão relativa de <i>sigF</i> na linhagem <i>sigL⁺⁺</i>	70
Figura 32. Expressão relativa de <i>sigL</i> nas linhagens $\Delta sigF$, <i>sigF⁺⁺</i> e <i>sigF⁺⁺ - T51E</i>	70
Figura 33. Fluxograma de análise dos dados de RNA-Seq.	71
Figura 34. Análise por <i>Heatmap</i> dos Resultados de RNA-Seq para comparação de todas as réplicas biológicas das linhagens analisadas.	72
Figura 35. <i>Heatmap</i> dos 40 genes com maior variação entre todas as amostras analisadas.	73
Figura 36. Organização estrutural da região do genoma de <i>Xac</i> onde estão os genes <i>sigF</i> e <i>sigL</i> e seus respectivos regulons.	77
Figura 37. Esquema dos domínios da PknB e das construções utilizadas.	78
Figura 38. Análise por SDS-PAGE das frações obtidas nas diferentes etapas de purificação de SigF e PknB.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes codificando fatores sigma ECF em <i>Xac</i>	27
Tabela 2: Linhagens de <i>E. coli</i>	33
Tabela 3: Linhagens de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	33
Tabela 4: Plasmídeos utilizados.....	34
Tabela 5: Construções utilizadas.....	34
Tabela 6: Oligonucleotídeos.....	35
Tabela 7. Construções para Expressão e Purificação SigF e PknB.....	44
Tabela 8. Genes com expressão aumentada na linhagem <i>sigL++</i>	74
Tabela 9. Genes em <i>sigF⁺⁺T51E</i> com expressão aumentada.....	76
Tabela 10. Resultado do Ensaio de Fosforilação.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Absorbância
ATP	Adenosina Trifosfato
Cm	Centímetro
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
G	Força g ou Relative centrifugal force (rcf)
G	Gramma
H	Hora
IPTG	Isopropil β-D-galactopiranosídeo
LIC	<i>Ligation-Independent Cloning</i>
mL	Mililitro
nM	Nanomolar
PCRq	PCR quantitativo
RNA	ácido ribonucléico (ribonucleic acid)
RNA _m	RNA mensageiro
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA (RNA Sequencing)
RT-PCR	<i>Real time - Polymerase Chain Reaction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SGC	<i>Structural Genomic Consortium</i>
subsp.	Subespécie
TB	Terrific Broth

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	13
1.1) <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	13
1.2) A Diversidade de Fatores Sigma Bacterianos.....	14
1.2.1) A Transcrição em Procariotos	14
1.2.2) Classificação dos fatores sigma.....	18
1.2.3) Grupo 4 da Família σ^{70} :Fatores sigma ECF	21
1.3) Fatores sigmas ECFs de <i>Xac</i> e o peculiar contexto genômico de SigF	26
2) OBJETIVOS.....	32
3) MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1) Linhagens, meios e condições de cultivo.....	33
3.2) Vetores, construções e oligonucleotídeos	34
3.3) Isolamento de plasmídeos, digestão com enzimas de restrição, ligação e sequenciamento.....	36
3.4) Transformação	37
3.5) Construção da linhagem de superexpressão e mutante por deleção	38
3.6) Construção de mutantes por mutagênese sítio-dirigido	39
3.7) Extração e Isolamento de RNA total	39
3.8) Ensaio de Patogenicidade e de Adesão a Folha	40
3.9) Ensaio de Formação de Biofilme.....	40
3.10) Ensaio de viabilidade em diferentes condições de crescimento e estresse	41
3.11) Obtenção de amostras de RNA total de <i>Xac</i> em contato com planta hospedeira... 41	
3.12) Ensaio de RT-PCR Quantitativo.....	42
3.13) Isolamento de RNA e preparo de bibliotecas para análises de transcriptoma	43
3.14) Expressão e Purificação das Proteínas SigF e PknB	43
3.15) Ensaio de Fosforilação <i>in vitro</i>	46
4) RESULTADOS	47
4.1) Construção das linhagens.....	47
4.2) Caracterização Funcional de SigF: Papel na Resposta a Estresses Ambientais e na Interação com Plantas Hospedeiras	51
4.2.1) Perfil de Crescimento em condições padrão de cultivo	51
4.2.2) Crescimento em Resposta a Carência de Metais.....	53

4.2.3) Ensaio de Patogenicidade e Formação de Biofilme em Superfícies Bióticas e Abióticas	55
4.2.4) Ensaio de estresse por UVC e por H ₂ O ₂	58
4.3) Caracterização Funcional de SigF: Papel na Competição com Microrganismos	59
4.4) Regulação de Genes que Codificam Componentes do SSVI de <i>Xac</i> por σ^F	61
4.5) Identificação dos Regulons de SigF e SigL	71
4.6) Fosforilação <i>in vitro</i> do σ^F pela Proteína Quinase PknB.	77
5) DISCUSSÃO.....	81
5.1) SigF e a Interação de <i>Xac</i> com o Hospedeiro e o Ambiente.....	81
5.2) Sinalização de SigF e SigL e a Regulação do SSVI	82
6) CONCLUSÕES.....	88
7) REFERÊNCIAS	89
8) ANEXOS.....	98

1) INTRODUÇÃO

1.1) *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) é um importante fitopatógeno que causa grandes perdas econômicas na citricultura em diversos países, inclusive o Brasil, principal produtor de laranja do mundo (Fonte: USDA, Julho/2016). Esta bactéria causa o cancro cítrico, também chamado de cancrose, em plantas da família Rutaceae, principalmente o gênero *Citrus*. Membros do gênero *Xanthomonas* pertencem à classe das Gammaproteobactérias. Suas principais características microbiológicas consistem na obrigatoriedade de aerobiose, não formação de esporos, ser Gram negativa, ter formato bacilar, e em geral, apresenta motilidade por um único flagelo polar (monotríquia) (Brunings & Gabriel 2003; Swings & Civetta 1993). Em cultivo *in vitro*, as colônias apresentam coloração amarela, devido à produção do pigmento xantomonadina, que confere a bactéria resistência aos danos causados por radiação UV (Poplawsky et al. 2000). Outros aspectos das colônias em cultivo *in vitro* com uso de meio sólido são alta viscosidade e borda lisa. O aspecto viscoso é obtido pela produção de um polissacarídeo extracelular (exopolissacarídeos -EPS) chamado goma xantana, usado como espessante na indústria alimentícia e farmacêutica (Sutherland 1993; Behlau & Belasque Júnior 2014).

A *Xac*, como as demais bactérias do gênero *Xanthomonas*, está sempre associada a plantas, não sendo, portanto, encontrada em outros ambientes, embora já tenha sido relatado que bactérias deste gênero possam sobreviver no solo em associação com tecidos vegetais mortos por períodos variáveis. A presença destas bactérias em associação a serrapilheira gera uma fonte de inóculo para infecção de outras plantas, provendo sua persistência e disseminação no ambiente (Stall et al. 1993). *Xac* pode sobreviver como epífita sobre a superfície das folhas da planta sem causar sintomas, até encontrar alguma abertura, tais como estômato e lesões nos tecidos foliares, pela qual tenha acesso ao mesófilo do tecido vegetal para colonização. A partir disto, desenvolve a cancrose, cuja sintomatologia consiste no aparecimento de lesões circulares com aspecto de encharcamento do tecido e de coloração amarela, com um ponto escurecido no centro. Com o progresso da infecção as lesões se tornam pústulas de coloração marron-clara, que evoluem para erupções das lesões (Figura 1). Assim, a exposição da infecção se torna uma fonte de transmissão para outras plantas, promovida muitas vezes pela chuva e vento (Brunings & Gabriel 2003; Behlau & Belasque Júnior 2014).

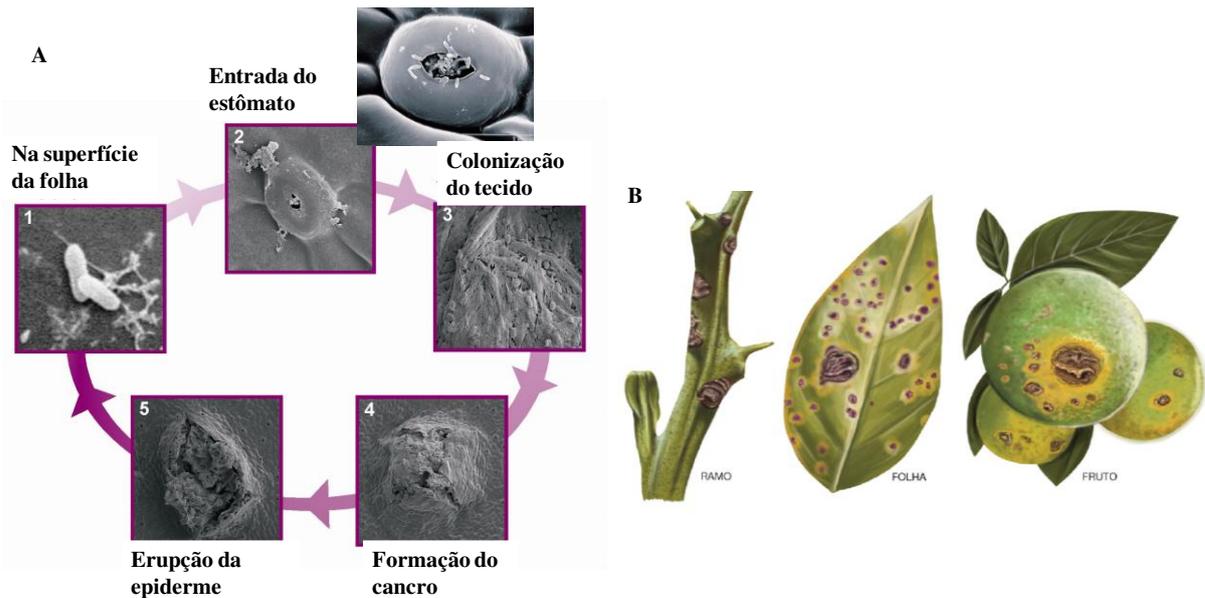


Figura 1. Processo de infecção e sintomas típicos do cancro cítrico.

(A) Ciclo da doença em plantas de citros. (B) Sintomas característicos da cancriose em ramos, folhas e frutos (Adaptado de Gottig et al. 2010; FUNDECITRUS 2008).

O genoma da linhagem *Xac* 306 foi sequenciado pelo grupo ONSA do Estado de São Paulo, revelando a presença de um cromossomo circular de 5.175.554 pares de bases, com 64,7% de conteúdo GC e 85,59% de seqüências codificadoras, totalizando 4.313 ORFs (Open Reading Frames -“regiões abertas de leitura”) (da Silva et al., 2002). Destas seqüências codificadoras 2.720 têm função determinada, 1.272 são proteínas hipotéticas conservadas e mais 331 codificam proteínas hipotéticas. O seu genoma ainda inclui dois plasmídeos: o menor com 33.699 pb, nomeado pXAC33, e outro com 64.920 pb, chamado de pXAC64 (da Silva et al., 2002). Dentre importantes fatores de virulência codificados no genoma de *Xac*, foi identificado pelo menos um conjunto gênico de cada grupo dos 6 tipos de sistemas de secreção (SSI a SSVI) de bactérias Gram-negativas (Boyer et al. 2009; Büttner & Bonas 2010). Os SS são maquinarias de translocação de proteínas essenciais para a virulência e adaptação ao ambiente em bactérias.

1.2) A Diversidade de Fatores Sigma Bacterianos

1.2.1) A Transcrição em Procariotos

Transcrição é o processo enzimático catalisado pela RNA Polimerase (RNAP) e que sintetiza RNA a partir de uma fita-molde de DNA, sendo a primeira das importantes etapas e de onde sobrevém a maior parte da regulação da expressão de genes em bactérias (Ebright 2000).

A RNAP é um complexo enzimático formado pelas subunidades α (2: α_I e α_{II}), β , β' , ω e pelo σ em eubactérias e possui duas formas funcionais distintas: uma denominada

cerne e a outra, holoenzima. As quatro primeiras subunidades citadas compõem o cerne da RNAP ($\beta\beta\alpha 2\omega$), que tem papel na elongação, sintetizando RNA com alta processividade e de maneira precisa, e na terminação em sítio específico. No entanto, o cerne não consegue se ligar de maneira específica a região promotora e promover o início da transcrição. Para isso, é necessária sua associação à subunidade dissociável sigma, formando a holoenzima ($\beta\beta\alpha 2\omega\sigma$) e conferindo a RNAP a capacidade de reconhecer os sítios promotores específicos no DNA, que determinam o início da transcrição (Burgess 1969; Burgess et al. 1969; Burgess 1971; Ebright 2000; Feklistov et al. 2014).

No cerne, as subunidades α possuem dois domínios unidos por regiões flexíveis. O domínio carboxi-terminal tem cerca de 26kDa, interage com região a montante do promotor, nomeada de elemento UP, situada aproximadamente na posição -60 a -35 do início de transcrição (+1), e pode interagir com reguladores transcricionais. O domínio amino-terminal da subunidade α tem cerca de 9kDa, interage com as subunidades β e β' e é responsável pela montagem da enzima. A subunidade ω de 11kDa se associa com a β' , atuando também na montagem e estabilizando o complexo enzimático. As subunidades β e β' formam o centro catalítico, o sítio ativo. Estas duas subunidades mantêm separadas em um sulco as fitas de DNA molde e codificante. É no sítio ativo que fica o híbrido DNA/RNA com cerca de 8 bases de nucleotídeos e o DNA a montante. O RNA é separado do DNA pelo poro de saída do RNA localizado na subunidade β (Blatter et al. 1994; Zhang et al. 1999; Gourse et al. 2000; A Darst 2001; Shanil P Haugen et al. 2008; Ghosh et al. 2010). As subunidades β e β' também interagem com a subunidade σ e esta interação ocorre por meio de múltiplos contatos (Gruber et al. 2001).

O fator sigma é a subunidade que tem a função de especificidade e reconhecimento da região promotora através dos seus determinantes de ligação ao DNA, não sendo, porém, capaz de desempenhar esta função sozinho. Enquanto o sigma não está ligado ao cerne, os determinantes para reconhecimento da região promotora não estão expostos. A ligação do fator sigma ao cerne da RNAP resulta em exposição destes determinantes. Assim, a enzima torna-se apta a se ligar de forma específica a região promotora e iniciar o processo de transcrição. A primeira sequência consenso do promotor reconhecida por fatores sigma a ser identificada foi a região -10 e em seguida a -35 (Figura 2), ambas localizadas a montante da posição +1 no sítio de início da transcrição. Estas sequências consenso são as principais e as demais são as regiões -10 estendida e discriminador (Gruber & Gross 2003; Shanil P. Haugen et al. 2008; Lee et al. 2012; Feklistov et al. 2014).

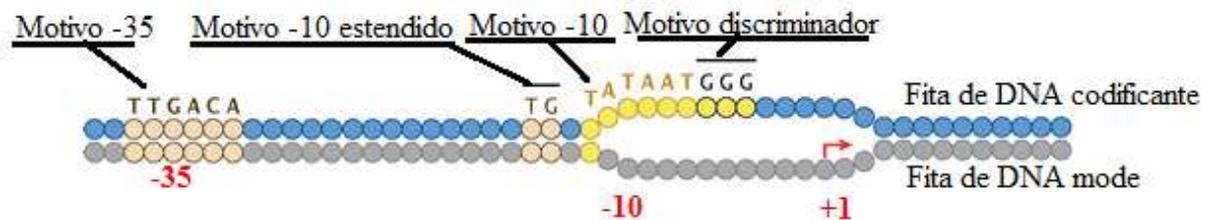


Figura 2. Promotor típico de fator sigma primário.
(Adaptado de Feklistov et al. 2014).

Os fatores sigma apresentam, estruturalmente, domínios globulares unidos por regiões flexíveis. Cada domínio globular possui regiões funcionais de ligação tanto ao cerne da RNAP como ao DNA, sendo divididos em sub-regiões de acordo com estas interações (Figura 3). O fator sigma clássico, o σ^{70} de *Escherichia coli*, possui quatro domínios denominados regiões σ_1 , σ_2 , σ_3 e σ_4 . As interações entre os domínios σ_4 e σ_2 - σ_3 com sítios específicos nas subunidades β e β' formam módulos rígidos que se movem independentemente, assim determinando o espaço de separação entre σ_2 e σ_4 e o reconhecimento por estes determinantes na região promotora. Assim, a sub-região $\sigma_{4.2}$ se liga ao elemento -35, a sub-região $\sigma_{2.4}$ ao -10, $\sigma_{3.0}$ interage com o elemento -10 estendido e a $\sigma_{1.2}$ com o discriminador (Figura 3)(Murakami & Darst 2003; Gruber & Gross 2003; Österberg et al. 2011).

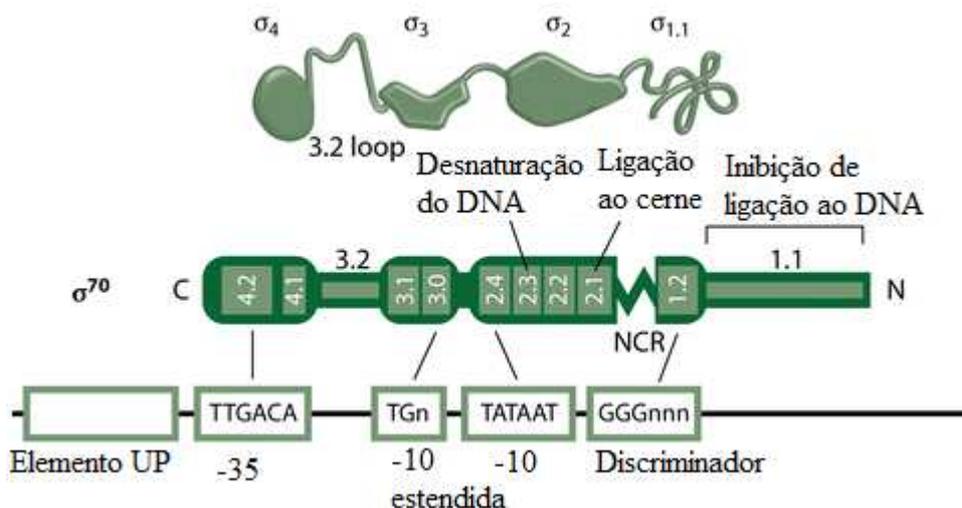


Figura 3. Domínios dos fatores sigma da família σ^{70} e suas funções e sub-regiões.
N, amino-terminal; C, carboxi-terminal; NCR, região não conservada (Adaptado de Österberg et al. 2011).

O início do processo de transcrição acontece em três etapas: formação do complexo fechado, seguido pelo complexo aberto e, por último, o complexo de iniciação (Figura 4). O processo começa com a associação do fator sigma ao cerne, formando a

holoenzima. Através do domínio σ_4 do sigma, a enzima reconhece o elemento -35 do promotor ainda no DNA em dupla fita. Em seguida, há o reconhecimento do elemento -10 pelo σ_2 . Assim, o complexo fechado é formado. Para passar deste para o complexo aberto ocorre a isomerização, onde um domínio da β' se fecha ao redor do DNA, formando o canal do sítio ativo e permitindo que o domínio σ_2 do fator sigma separe a dupla fita. Então, com a entrada de um nucleotídeo trifosfato no segundo canal da RNAP, há o pareamento com o nucleotídeo +1 na fita molde e, assim, se inicia a síntese de RNA, que progride até 10 nucleotídeos com o complexo de iniciação. Nesta etapa denominada de síntese abortiva, a região 3.2 do fator sigma bloqueia o canal de saída do RNA, o que faz a síntese parar, com a subsequente liberação do pequeno RNA recém-sintetizado. O motivo disto acontecer ainda não é compreendido. A síntese abortiva ocorre algumas vezes até a holoenzima conseguir sintetizar um RNA maior que 10 nucleotídeos e as interações com as regiões do promotor serem desfeitas. Assim, o fator sigma é liberado e a RNA polimerase perde afinidade pelo promotor e consegue continuar a síntese entrando na fase de alongação (Hsu 2002; Feklistov et al. 2014; Ruff et al. 2015).

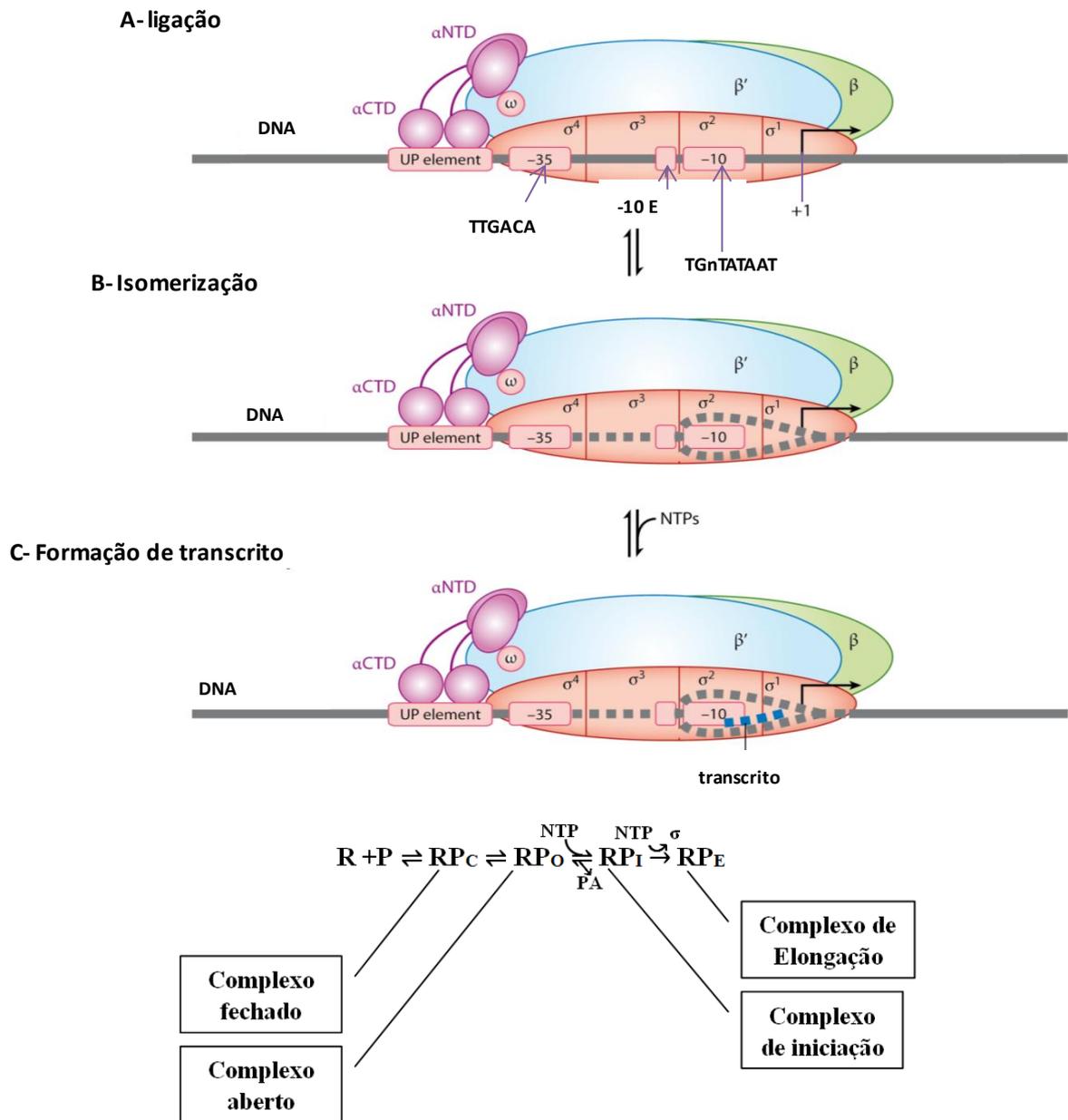


Figura 4. Etapas do Início de Transcrição.

R, RNA polimerase; P, promotor; PA, produto abortivo; NTP, nucleotídeos trifosfatos; -10 E, elemento -10 estendido do promotor (Adaptado de Lee et al. 2012).

1.2.2) Classificação dos fatores sigma

Os fatores sigma foram classificados em duas famílias distintas de acordo com características peculiares a cada uma: famílias σ^{70} e σ^{54} . Esta classificação foi fundamentada em análises filogenéticas, de similaridade de sequências, dos motivos reconhecidos nas regiões promotoras e por ser ou não dependente de ativador para iniciar a transcrição (Lonetto et al. 1992; Wösten 1998; Paget & Helmann 2003; Ghosh et al. 2010).

A família σ^{54} é composta apenas por um tipo de fator sigma, o σ^{54} ou σ^N , bastante divergente dos membros da família σ^{70} em termos de sequência, estrutura e mecanismo de ativação. Membros desta família estão amplamente distribuídos nas bactérias e são considerados fatores sigma alternativos, porque atuam em condições específicas de crescimento, assim como grande parte dos fatores sigma da família σ^{70} . Este fator sigma foi pela primeira vez identificado na bactéria entérica *Salmonella typhimurium* por seu envolvimento na regulação de genes para o metabolismo de nitrogênio (Garcia et al., 1977). Porém, a sua função como fator sigma foi descrita somente 12 anos depois, através de purificação da proteína (Garcia et al. 1977; Hunt & Magasanik 1985; Hirschman et al. 1985; revisado em Merrick 1993). Apesar de sua associação inicialmente ao metabolismo de nitrogênio, membros desta família podem atuar na regulação de conjuntos gênicos com papéis em diversas outras funções biológicas (Merrick 1993).

As sequências consenso no promotor reconhecidas pelo σ^{54} são as regiões -24 (TGGCAC) e -12 (TTGC). Este fator sigma associado a RNAP não consegue dar início a transcrição, apenas reconhece a região promotora e forma o complexo fechado (holoenzima e DNA), precisando de uma proteína ativadora especializada dependente de ATP para abrir a hélice de DNA e, assim, formar o complexo aberto. Diferente dos demais fatores sigma, membros desta família possuem 3 regiões funcionais. A região III tem os determinantes de ligação ao DNA, a II é ausente em algumas espécies e está relacionado a separação das fitas de DNA, enquanto a região I, na parte amino-terminal da proteína, é a responsável por inibir a isomerização e o início de transcrição da RNAP na ausência do ativador. Assim, ela se liga a região promotora -12 e interage com o ativador, resultando na separação na dupla fita de DNA para iniciar a transcrição (revisado em Merrick 1993; Wösten 1998; Buck et al. 2000).

Por outro lado, a família σ^{70} inclui todos os demais fatores sigma bacterianos, sendo dividida em quatro grandes grupos filogenéticos, com base em análises de estrutura e função (Figura 5). Esta família é relacionada ao fator sigma primário de *E. coli*, o primeiro sigma identificado por Burgess e colaboradores em 1969 (Lonetto et al. 1992; Burgess et al. 1969).

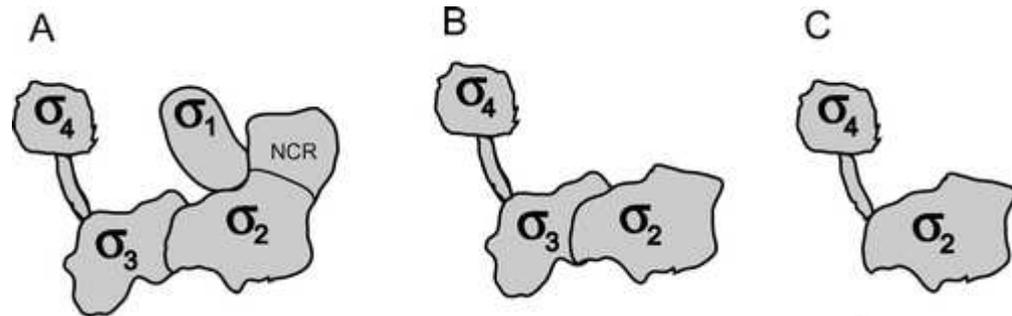


Figura 5. Domínios apresentados pelos diferentes grupos de fatores sigmas da família σ^{70} .
(A) Grupo 1; (B) Grupo 3; (C) Grupo 4 (Fonte: Gruber & Gross 2003).

O Grupo 1 é composto pelo fator σ^{70} propriamente dito, também chamado de sigma vegetativo, pois é responsável pela transcrição de genes essenciais, que visam à manutenção da célula, também chamados pelo termo em inglês “housekeeping”. Os sigmas deste grupo apresentam as regiões σ_1 a σ_4 e somente neste grupo é possível identificar a presença da subregião 1.1 na parte amino-terminal da proteína. Esta região auxilia na estabilização do complexo aberto e pode também inibir a transcrição em alguns promotores, atuando, portanto, em uma etapa de regulação, já que o σ^{70} é o mais abundante dentro da célula. Quando o sigma não está associado ao cerne da RNAP, esta sub-região inibe a interação ao DNA (Gruber & Gross 2003; Murakami & Darst 2003).

Os membros dos Grupos 2 a 4 são chamados sigmas alternativos, pois estão presentes em condições específicas de crescimento e regulam grupos distintos de genes para resposta e adaptação a estas condições, como na esporulação, resposta a estresses ambientais, entrada na fase estacionária, interação com células hospedeiras, entre outros (Helmann 2002; Paget & Helmann 2003; Brooks & Buchanan 2008; Murakami 2015).

No grupo 2 estão os fatores sigma que são estruturalmente similares ao grupo 1, apresentando as regiões σ_1 a σ_4 , porém, não são essenciais ao crescimento exponencial celular. Nestes sigmas, as regiões de ligação ao DNA são altamente similares ao do grupo 1, o que sugere que eles atuem no reconhecimento de promotores similares. O σ^S de *E. coli* é um representante deste grupo e atua mediando a resposta geral a estresses (Lonetto et al. 1992; Battesti et al. 2011).

O grupo 3 tem como importante representante o σ^H , o fator sigma de resposta a choque térmico em *E. coli*. Membros deste grupo não possuem a região σ_1 , apenas σ_2 , σ_3 e σ_4 . Os elementos -35 e -10 das regiões promotoras por eles reconhecidas apresentam variação

entre os membros do grupo e são bastante distintos em relação aos reconhecidos pelos sigmas dos grupos 1 e 2. No entanto, há uma correlação no reconhecimento da região -10 estendida pela região σ_3 . Em geral, os sigmas deste grupo regulam genes que desempenham funções associadas a biossíntese de flagelo, choque térmico, estresse geral e esporulação (Lonetto et al. 1992; Paget 2015).

O grupo 4 de fatores sigma agrupam aqueles que possuem apenas as regiões σ_2 e σ_4 . Geralmente, estão associados a fatores anti-sigma, proteínas que se associam a eles e impedem sua ligação a RNAP. São os sigmas mais divergentes da família σ^{70} e, por isso, foram os mais recentemente identificados como membros da família por Lonetto e colaboradores, em 1994 (Lonetto et al. 1992; Feklistov et al. 2014).

1.2.3) Grupo 4 da Família σ^{70} : Fatores sigma ECF

A denominação de grupo 4 de fatores sigma foi proposto por Helmann seguindo a subdivisão em grupos de 1-3 estabelecida anteriormente por Lonetto e colaboradores em 1992 dentro da família σ^{70} (Helmann 2002; Lonetto et al. 1992). Este grupo havia sido nomeado em 1994 como fatores sigma (ECFs) de Função Extracitoplasmática (do inglês Extracytoplasmic function), por atuarem na regulação de genes de respostas associadas a algum aspecto do envelope celular ou de transporte e ainda é conhecido por este nome apesar da renomeação para grupo 4 (Lonetto et al. 1994; Helmann 2002). Além das características já citadas referentes a estrutura proteica, os fatores sigma deste grupo compartilham particularidades comuns a todos ou, em alguns casos, a grande maioria de seus membros, conforme tratado a seguir (Helmann 2002; Feklistov et al. 2014).

A primeira característica dos fatores sigma do grupo 4 é o reconhecimento de promotores alternativos, com alta conservação da sequência AAC no elemento -35 (Lane et al. 2006; Helmann 2002) e CGT no -10 (Staroń et al. 2009). Além disto, apenas as regiões ou domínios σ_4 e σ_2 são suficientes para ligação ao cerne da RNA polimerase e a estes elementos do promotor no DNA. Esta característica os tornam mais estridentes no reconhecimento de promotores em relação aos fatores sigmas essenciais, que têm maior flexibilidade, por serem capazes de fazer mais combinações entre os determinantes de reconhecimento do promotor nos domínios σ_4 , σ_3 e σ_2 . Os sigmas essenciais têm alta capacidade de desnaturação do DNA, isto porque tem duas cavidades no domínio σ_2 que interagem com duas bases do motivo -10 da fita codificante, fazendo com que estas bases se virem para esta cavidade. Já os sigmas ECF tem uma capacidade de desnaturação reduzida,

pois têm apenas uma cavidade para interações hidrofóbicas e de pontes de hidrogênio com uma citosina na região -10 do promotor (Figura 6) (Feklistov et al. 2014; Campagne et al. 2014; Campagne et al. 2015).

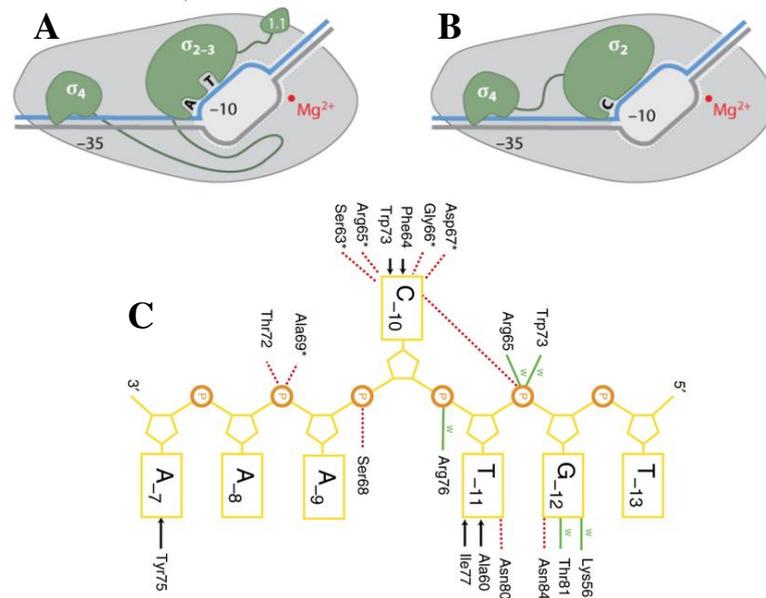


Figura 6. Comparação das interações entre o domínio σ_2 dos fatores sigma dos grupos 1 e 4 com suas regiões promotoras -10 correspondentes.

A) Esquema da holoenzima RNAP com destaque para as duas cavidades do domínio σ_2 e suas respectivas interações com as bases A e T da região promotora -10 nos fatores sigmas essenciais. B) Destaque para a cavidade única do mesmo domínio e sua interação com a base C em fatores sigma ECF. C) Detalhes das interações entre os resíduos do domínio σ_2 e a região promotora -10. Interações de pontes de hidrogênio, hidrofóbicas e contatos mediados por água são representadas em pontilhados vermelhos, setas em preto e linhas verdes, nesta ordem (Adaptado de Feklistov et al. 2014; e Campagne et al. 2014).

A segunda característica é referente a co-expressão dos sigmas com suas proteínas reguladoras, os fatores anti-sigma, cujos genes estão, em geral, em um mesmo *operon* com o gene que codifica o fator sigma. Os fatores anti-sigma se ligam aos sigmas correspondentes omitindo seus determinantes de interação com o cerne na ausência de sinal e os mantém inativos, assim impedindo sua disponibilização no citoplasma e ligação a RNAP. A presença de um sinal ou estímulo é percebida pela inativação do anti- σ , o que leva a liberação do σ , que se torna disponível para recrutar o cerne da RNA polimerase e iniciar a transcrição do seu *regulon*. Os fatores anti- σ são proteínas transmembrana com domínio sensor extracitoplásmico e um domínio inibitório voltado para o citoplasma (Paget 2015; Pinto & Mascher 2016).

A terceira e última característica geral dos sigmas ECF é a auto-regulação positiva. Assim, a maioria dos membros desta família reconhecem promotores localizados a montante do gene que os codifica. Esta característica favorece um aumento rápido nos níveis

intracelulares do fator sigma na presença de sinal indutor, favorecendo a competição pelo cerne e, com isso, a transcrição dos genes de resposta para a condição específica em que é necessário. Além disto, favorece também um rápido desligamento da resposta quando o sinal indutor cessa, devido a co-expressão do anti-sigma correspondente (Helmann 2002; Paget 2015; Pinto & Mascher 2016).

Os fatores sigma ECF podem ser regulados por diferentes mecanismos. Os principais e com algum dado experimental na literatura são discutidos a seguir. A Figura 8 mostra um esquema de cada um dos mecanismos já caracterizados e resumidos ao longo do texto. Atualmente, o mecanismo de regulação mais estudado e compreendido é por proteólise, tendo sido completamente elucidado no modelo de sigma σ^E/σ^{24} de *E. coli* (Figura 7 e Figura 8A) (Erickson & Gross 1989). Neste mecanismo, há uma sequência de proteólises que inativa o fator anti- σ em três sítios. A proteína RseA é o anti- σ do sigma σ^E/σ^{24} de *E. coli*, porém, quem atua como proteína sensora detectando o acúmulo de proteínas desenoveladas no periplasma de *E. coli* é a serina protease DegS. Além disso, ela realiza a primeira clivagem de RseA em sua porção periplasmática, o que desencadeia uma segunda clivagem, realizada pela metaloprotease RseP que cliva na região embebida transmembrana de RseA, liberando o σ^E acoplado ao domínio citoplasmático de RseA (complexo σ^E -RseA) no citoplasma. A SspB, uma proteína adaptadora, liga-se a este complexo o que facilita a proteólise direcionando-o para a clivagem por ClpXP. Com isso, o σ é liberado para competir e interagir pelo cerne da RNAP com os demais fatores sigma disponíveis no citoplasma (revisado em Barchinger & Ades 2013). Outros fatores sigma têm este mesmo mecanismo de regulação, como é o caso do σ^{AlgU} , envolvido na patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* através da regulação na síntese de mucopolissacarídeo (Martin et al. 1993) e o σ^{W} da bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, que atua na resposta a antibióticos em estresse no peptidoglicano ou a outros tipos de estresse, como o alcalino e na membrana (revisado em Ho & Ellermeier 2012; Helmann 2016).

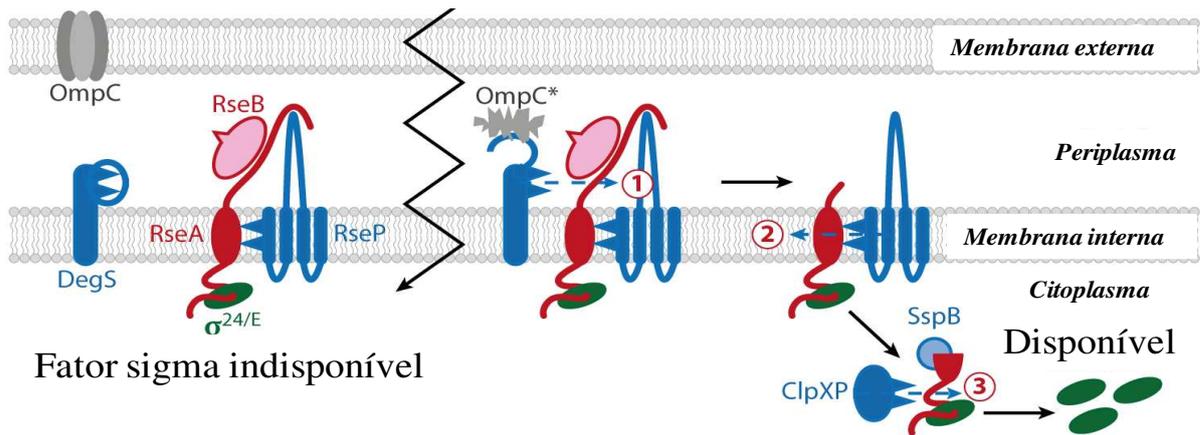


Figura 7. Regulação de Fator Sigma ECF por Proteólise.

Representação gráfica da regulação por proteólise de subgrupo de fatores sigma ECF. OmpC, proteína de membrana externa em estado enovelado e OmpC* corresponde a mesma proteína, porém desnaturada; DegS, protease que realiza a primeira clivagem de RseA no periplasma após perceber proteínas de membrana externa desnaturadas; RseB, co-anti-sigma, proteína que impede proteólise de RseA por DegS na ausência de sinal; RseA, anti-sigma do fator sigma E de *E. coli*; RseP, protease responsável pela clivagem de RseA no segundo sítio (intramembrana); SspB, proteína adaptadora que direciona o complexo σ^E -RseA para última clivagem; ClpXP, protease que realiza a última clivagem de RseA para liberação do σ^E . 1, 2 e 3, indicam os três sítios de proteólise (Adaptado de Österberg et al. 2011).

A regulação por interação proteína-proteína é outro mecanismo já bem estudado, cujo modelo é o σ^{FecI} de *E. coli*, que atua na regulação de genes para a captação de ferro (Figura 8C). Neste caso, o estímulo é desencadeado pela disponibilidade do substrato extracelular citrato férrico. Este substrato se liga a uma proteína de membrana externa chamada FecA, proteína dependente de TonB que atua tanto no transporte de ferro como na sinalização de transdução de sinal. Esta última função é realizada através de seu domínio amino-terminal que permite sua interação com o anti-sigma FecR na membrana citoplásmica e, quando isto ocorre, o sigma FecI é liberado (Enz et al. 2000; Braun et al. 2006).

Em α -proteobactérias, que não possuem o fator σ^S , a resposta geral a estresses é mediada pelo fator sigma EcfG, cuja atividade é regulada por um mecanismo de comutação de parceiro baseado em mimetização de fator sigma. Neste modelo, inicialmente caracterizado em *Methylobacterium extorquens* por Gourion et al e em seguida em *Sinorhizobium meliloti* (RpoE2) e *Caulobacter crescentus* (SigT) em trabalhos independentes, uma proteína anti-anti- σ é fosforilada por uma histidina quinase em presença de sinal. A fosforilação libera seu domínio que mimetiza um fator sigma para se ligar ao anti-sigma e este, por sua vez, libera o sigma para atuar na expressão de genes do seu *regulon* correspondente (Figura 8D). Assim, neste modelo de regulação, a percepção do sinal ocorre através de um sistema de dois componentes acoplado ao anti-sigma (Gourion et al. 2006; Sauviac et al. 2007; Lourenço et al. 2011; Francez-Charlot et al. 2009; Francez-Charlot et al. 2015).

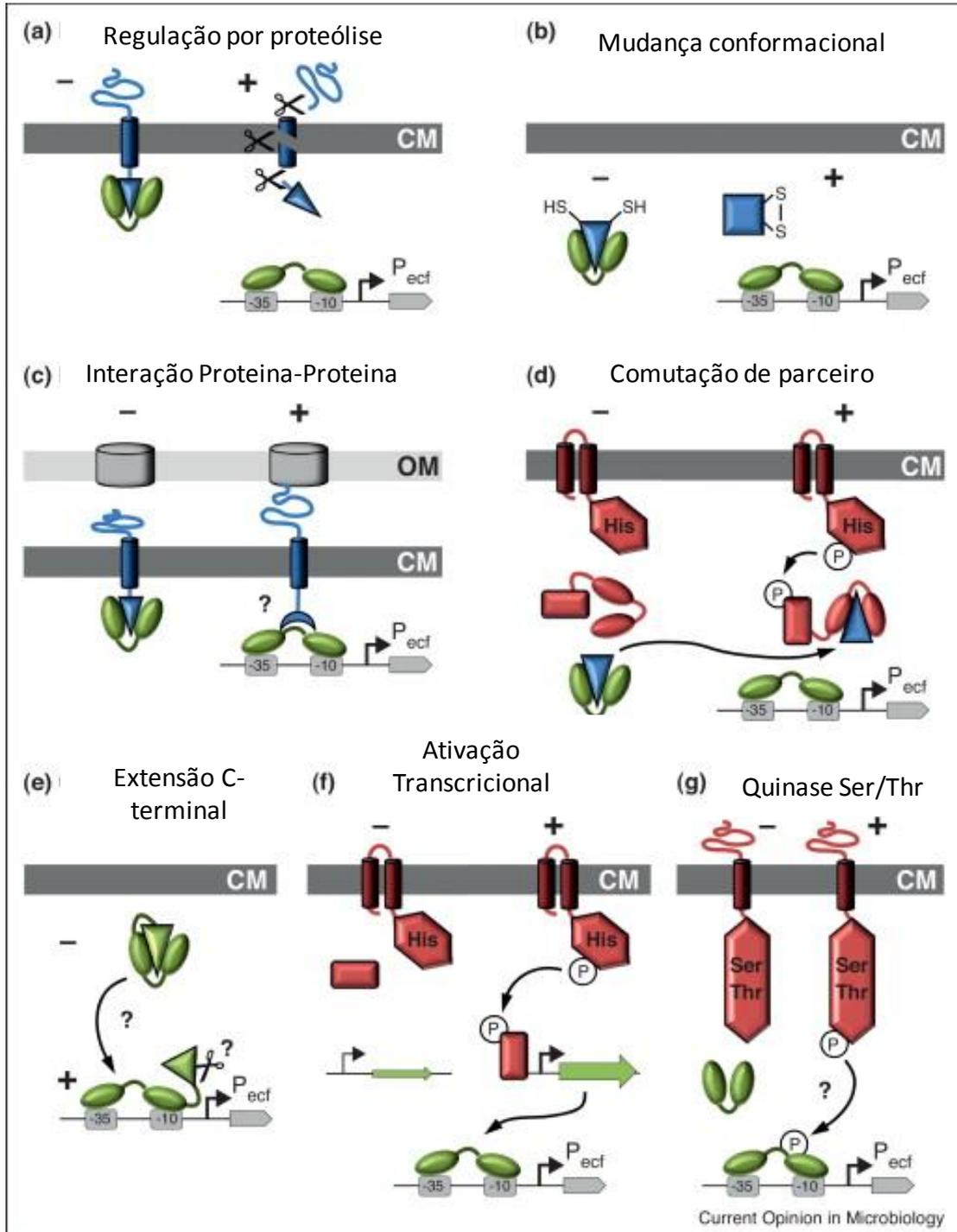


Figura 8. Diversidade de mecanismos para regulação de fatores sigma ECF.

Sinal negativo (-) e positivo (+), representam ausência ou presença de estímulo, nesta ordem; Fatores anti-sigma, estão em azul; Fatores sigmas, em verde; Proteínas regulatórias relacionadas a processos de fosforilação, em vermelho; CM, membrana citoplásmica; OM, membrana externa; P no círculo, grupo fosfato; P, região promotora (Adaptado de Mascher 2013).

Outro modo de regulação é através de anti-sigmas solúveis no citoplasma e que não possuem domínios transmembrana, como descrito para o par RpoE-ChrR em *Rhodobacter sphaeroides* (Dufour et al. 2008) e SigR-RsrA em *Streptomyces coelicolor* (Paget et al. 2001).

Neste caso, em resposta a estresse oxidativo ocorre uma alteração conformacional no anti-sigma, que leva a liberação do fator sigma (Figura 8B) (revisado em Pinto & Mascher 2016).

Alguns fatores sigma ECFs não apresentam um anti- σ aparente. Dentre estes, existem alguns exemplos cuja regulação já foi estudada. Um deles, o SigE de *S. coelicolor* está associado a um sistema de dois componentes, o CseC histidina quinase (proteína sensora transmembrana) e o regulador de resposta CseB. Este sistema é responsável pela regulação transcricional de SigE uma vez que dados experimentais sugerem que a sua transcrição é ativada por CseB (Paget et al. 1999). Outros sigmas sem anti- σ aparente têm uma extensão C-terminal relacionada a sua própria regulação. Para *Myxococcus xanthus*, esta extensão C-terminal é necessária para o fator sigma CorE ser funcional, sendo que sua forma ativa é obtida com Cu(II) e a inativa com Cu(I) (Gómez-Santos et al. 2011; revisado em Pinto & Mascher 2016).

Os membros deste grupo foram subdivididos em mais de 43 subgrupos distintos, com base em similaridade na sequência, mecanismos de regulação de sua atividade por fatores anti-sigma ou não, conservação do contexto genômico e potenciais motivos de promotores alvos (Starón et al. 2009). Os grupos foram nomeados com a sigla ECF seguido por um número. Os membros dos grupos ECF43, podem ter um mecanismo de regulação diferenciado envolvendo uma serina/treonina quinase (Figura 8G), como sugerido por seu contexto genômico. No entanto, ainda não foram caracterizados.

1.3) Fatores sigmas ECFs de *Xac* e o peculiar contexto genômico de SigF

A análise dos genomas bacterianos demonstra que o conjunto de fatores sigmas que determinada espécie bacteriana apresenta reflete seu estilo de vida. Por exemplo, *E. coli* tem 7 sigmas alternativos, enquanto bactérias adaptadas a diversos ambientes chegam a ter 60 sigmas alternativos, como é o caso de *Streptomyces coelicolor* (Österberg et al. 2011).

No genoma de *Xac* são encontrados 14 genes que codificam fatores sigma, sendo um deles o σ^{70} ou RpoD, o fator sigma primário que tem atividade sobre os genes de manutenção. Os demais codificam fatores sigma alternativos que medeiam respostas a condições específicas de crescimento. Dois deles pertencem a família σ^{54} (*xac1969* e *xac2972*). Outros dois genes codificam sigmas do grupo 3 da família σ^{70} : $\sigma^{Flia}_{xac1933}$ e $\sigma^{32}_{xac3824}$. Os 9 genes restantes codificam fatores sigma ECF: *xac0922*, *xac1319*, *xac1380*, *xac1682*, *xac2191*, *xac2814*, *xac3989*, *xac4128* e *xac4129*. Com o uso da ferramenta online

ECF finder, cinco destes sigmas ECF foram alocados dentro dos subgrupos descritos por Staron (2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Genes codificando fatores sigma ECF em *Xac*.

<i>Locus</i> dos Genes	Classificação	Contexto genômico / Mecanismo de sinalização	Função	Referência
<i>xac0922</i>	-	Desconhecido	Desconhecida	-
<i>xac1319</i>	ECF02 e ECF01	Possivelmente proteólise (Figura 8A)	Desconhecida	-
<i>xac1380</i>	ECF18	Anti-sigma putativo com domínio transmembrana e mecanismo de sinalização desconhecido.	Desconhecida	-
<i>xac1682</i>	-	Desconhecido	Desconhecida	-
<i>xac2191</i>	-	Desconhecido	Desconhecida	-
<i>xac2814</i>	ECF22	Sem contexto genômico conservado e sem fator anti-sigma aparente.	Desconhecida	-
<i>xac3989</i>	ECF26	Tem gene codificando proteína associada a membrana com domínio anti-sigma, de catalase e citocromo C putativos, um dos três tipos de contextos genômicos encontrados para o grupo ECF26.	Desconhecida	-
<i>xac4128</i>	ECF43	Ser/Thr Quinase (Figura 8G)	Regulação do SSVI	Este trabalho
<i>xac4129</i>	-	Possivelmente interação proteína-proteína, presença de anti-sigma FecR e sensor FecA (Figura 8C)	Possivelmente deficiência de ferro	Aini et al. 2010

Entre os ECFs de *Xac*, o gene *xac4128*, denominado neste trabalho como *sigF*, pode ser classificado no grupo ECF43 (Tabela 1), no qual estão inclusas proteínas que apresentam um interessante e conservado contexto genômico: próximo ao gene que codifica o fator sigma ECF há um que codifica uma proteína serina/treonina (Ser/Thr) quinase e não há um gene codificando um fator anti-sigma aparente na vizinhança. Para *sigF* o gene que codifica a Ser/Thr quinase é chamado de *pknB_{xac4127}*. Tal contexto genômico sugere que este grupo de fatores sigma ECF seja regulado diretamente por fosforilação em resíduos de serina ou treonina pela quinase, um mecanismo de regulação não descrito ainda para fatores sigma.

Até o momento 36 membros deste subgrupo de ECF foram encontrados em genomas bacterianos, sendo distribuídos entre os filos *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Plantomycetes* e *Proteobacteria* (Staroń et al. 2009; Mascher 2013).

Ser/Thr quinases (STKs) são catalizadoras de fosforilação nos aminoácidos serinas ou treoninas de proteínas. A adição ou remoção de grupos fosfato em bactérias foi demonstrada, inicialmente em resíduos de histidina e ácido aspártico no mecanismo de transdução de sinal através de sistemas de dois componentes (TCS) e também em sistema de fosfotransferência do tipo relé de fosfato (revisado em Pereira et al. 2011). A fosforilação de serinas/treoninas foi descrito primeiro para eucariotos e, por muito tempo, foi considerada exclusiva de *Eukarya* (Bakal & Davies 2000). No entanto, em 1979, foi descrita a primeira fosforilação de serina na bactéria *E. coli* por uma quinase/fosfatase sem homologia com as de eucariotos (Garnak & Reeves 1979; Laportes & Chung 1985; revisado em Pereira et al. 2011). Posteriormente, a Pkn1 de *Myxococcus xanthus* foi caracterizada como a primeira a apresentar tal homologia (Muñoz-Dorado et al. 1991). Estas quinases são denominadas de eSTK (do inglês *Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases*) ou quinases do tipo Hanks. O sequenciamento de genomas bacterianos levou a identificação de diversas eSTKs (Pereira et al. 2011; Whitmore & Lamont 2012), sugerindo que este mecanismo de regulação de grande importância seja amplamente distribuído em bactérias.

A PknB de *Mycobacterium tuberculosis* foi a primeira eSTK a ter sua estrutura descrita e possui um domínio quinase associado a uma hélice transmembrana que, por sua vez, está ligada a domínio extracelular responsável pela percepção e transdução do sinal para ativação do domínio quinase (Mieczkowski et al. 2008; Young et al. 2003). Porém, outras eSTK já identificadas possuem apenas o domínio quinase e uma hélice transmembrana, ou ainda, apenas um domínio quinase solúvel (Pereira et al. 2011). A quinase codificada pelo gene *pknB_{xac4127}* possui uma organização de domínios similar a PknB de *M. tuberculosis*, com um domínio quinase na metade amino-terminal, uma região transmembrana central e um domínio possivelmente extracitoplasmático (Figura 9B).

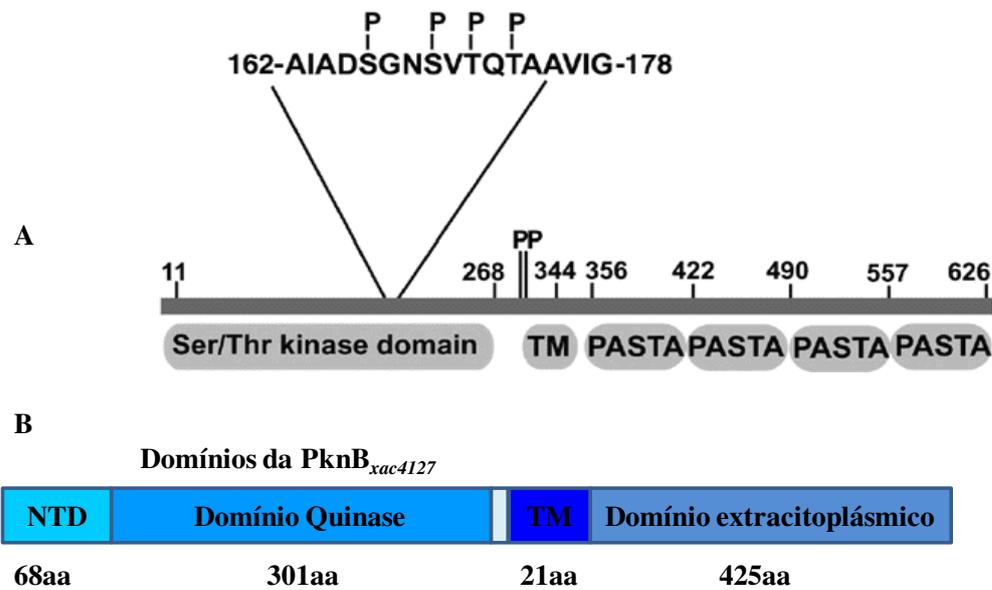


Figura 9. Estruturas da PknB de *M. tuberculosis* e de *Xac*.

(A) Estrutura da PknB de *M. tuberculosis* (Fonte: Young et al. 2003). (B) Esquematização de possível estrutura do PknB_{xac4127} de *Xac*. TM, transmembrana; PASTA, domínio de proteínas de ligação a penicilina; aa, aminoácidos.

As eSTK já caracterizadas estão associadas a regulação de diversas funções biológicas, incluindo desenvolvimento em *M. xanthus* (Muñoz-Dorado et al. 1991), produção de metabólitos secundários em *S. coelicolor* (Atsushi et al. 1994) e virulência em *Yersinia pseudotuberculosis* (Galyov et al. 1993). Proteínas quinases bacterianas também podem estar envolvidas com cascata de regulação de fatores sigma. A fosforilação direta por PknB já foi descrita para o SigH de *M. tuberculosis*, porém, sua importância para a ativação deste sigma não foi elucidada, pois não houve alteração em sua interação com o anti-sigma RshA e estudos sobre o efeito na transcrição não foram realizados. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que PknB também fosforila RshAe que, neste caso, ocorre diminuição na formação do complexo SigH-RseA (Park et al. 2008). No caso da quinase SpoIIAB em *Bacillus subtilis*, ela fosforila um anti-anti-sigma, o SpoIIAA. Ainda em *B. subtilis* o anti-sigma com domínio de quinase RsbW participa de uma complexa rede de regulação, que culmina no controle da atividade do fator sigma de resposta geral a estresse, o σ^B . A regulação do σ^B é através de comutação de parceiros. Assim, numa condição de estresse a RsbW libera o sigma e liga-se ao anti-anti-sigma RsbV em estado desfosforilado. Quando cessa o estresse, a RsbW fosforila a RsbV e a inativa. Assim, a RsbW volta a sequestrar o sigma (Pereira et al. 2011; Whitmore & Lamont 2012; Cousin et al. 2013; Dworkin 2015; Guldemann et al. 2016).

Curiosamente, o gene *xac4129* (*sigL*), localizado na vizinhança de *sigF*, também codifica um fator sigma do grupo 4 (ECF) como mostra a Figura 10, o que pode indicar

regulação cruzada entre estes fatores sigma, com possível sobreposição de funções, ou, alternativamente, uma cascata de regulação entre estes fatores sigma.

Outro fato importante a se destacar sobre o *sigF* é a sua localização dentro do *cluster* genômico que codifica um Sistema de Secreção do Tipo VI (SSVI), o que pode indicar um possível papel deste fator sigma na regulação deste importante complexo de secreção (Figura 10).

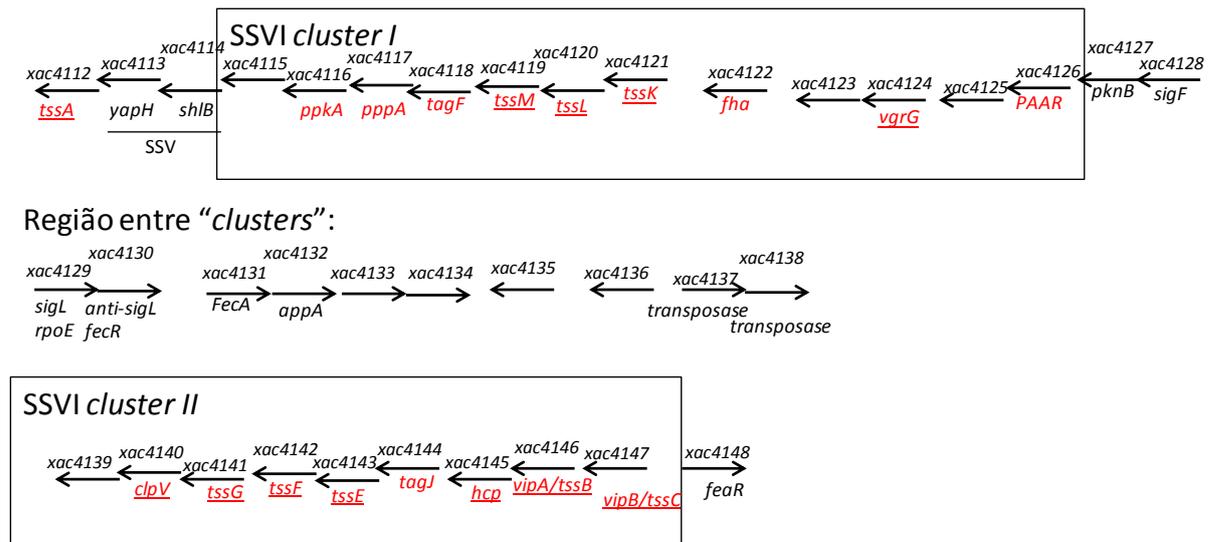


Figura 10. Contexto genômico de *xac4128*, ou *sigF* em *Xac*.

Esquema mostrando a organização estrutural da região do genoma de *Xac* onde o gene *sigF* está localizado. Destacam-se o gene *pknB*, que codifica a Ser/Thr quinase, e o gene *sigL*, que codifica outro fator sigma ECF. Os genes marcados em vermelho são homólogos aos componentes do SSVI de outros organismos (Boyer et al. 2009). As setas não estão em escala com o tamanho dos genes.

Sistemas de Secreção (SS) são complexos proteicos alocados no envelope celular cuja função consiste em translocar ou secretar substratos (proteínas, pequenas moléculas ou DNA) para o meio extracelular ou dentro de uma célula alvo. As bactérias empregam estes sistemas em diversas e importantes funções como adesão, patogenicidade, adaptação e sobrevivência. As gram-negativas possuem seis tipos: SSI, SSII, SSIII, SSIV, SSV e SSVI. Os SSVI foram os mais recentemente identificados e, em geral, estão envolvidos com a translocação de toxinas para patogenicidade e competição contra microrganismos (procarióticos e eucarióticos) (Costa et al. 2015). Em 2006, foi descrito em *Vibrio cholerae* usando *Dictyostelium* como modelo de hospedeiro e *P.aeruginosa* (Pukatzki et al. 2006; Hood et al. 2010). O SSVI de *Xac* ainda não foi caracterizado e está em estudo no laboratório da Profa. Dra. Cristina Alvarez-Martinez.

Tendo como base o que já foi apresentado acima, este trabalho teve como propósito a caracterização de SigF em linhagens de *Xac* com níveis alterados deste ECF. Desta forma, buscamos identificar através de análises fenotípicas e de expressão gênica a condição em que é requerido e os genes regulados por este fator sigma.

2) OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar a função do gene *sigF_{xac4128}* na fisiologia de *Xanthomonas citri* pv.*citri*, identificando os genes regulados por este fator sigma e as condições de crescimento nas quais este gene é essencial. Além disto, o trabalho se propôs a testar um novo mecanismo de sinalização envolvendo fosforilação direta deste fator sigma por uma Ser/Thr quinase e possível cascata de regulação envolvendo o fator SigL.

Para alcançar estes objetivos, as metodologias abordadas foram: i) análise fenotípica de linhagens com níveis alterados de *sigF_{xac4128}* (linhagens com deleção não-polar do gene e de superexpressão); ii) estudo do transcriptoma de linhagens expressando níveis elevados do fator sigma tanto na versão selvagem como na versão fosforilada; iii) análises *in vitro* de fosforilação direta do $\sigma^{sigF/xac4128}$ pela PknB; iv) análise do transcriptoma de linhagem super-expressando de *sigL*.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Linhagens, meios e condições de cultivo

Neste trabalho foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli*) para clonagem, expressão e purificação de proteínas que estão descritas na Tabela 2.

As linhagens de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* para estudos funcionais dos genes aqui abordados estão na Tabela 3.

Tabela 2: Linhagens de *E. coli*.

Linhagens	Características	Referência/Fonte
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 realA1</i> .	(Hanahan 1983)
BL21(DE3)-R3-pRARE2	Derivada da BL21(DE3) (<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dam</i> (DE3)) com plasmídeo pRARE2 (Cm ^r) codificando tRNAs que reconhecem códons raros em <i>E. coli</i> ,	(Savitsky et al. 2010)
BL21(DE3)-R3-lambda-PPase	Co-expresssão de fosfatase lambda em plasmídeo que confere resistência a cloranfenicol e que também expressa 3 códons raros de tRNA; plasmídeo pACYC-LIC+ (de Toronto)	(Savitsky et al. 2010)

Tabela 3: Linhagens de *X. citri* subsp. *citri*.

Linhagens	Características	Referência
Xac306	Isolado 306 de Xac, cepa selvagem.	(da Silva et al. 2002)
CM001	Derivada da Xac306. Mutante com deleção em fase do gene <i>sigF_{xac4128}</i> (construção pL003).	Este trabalho

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37°C, em meio LB (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5). Os antibióticos utilizados para seleção de *E. coli* foram: canamicina (50µg/ml), estreptomicina (100µg/ml) e cloranfenicol (34µg/ml). As linhagens de *Xac* foram cultivadas a 30°C em meio 2xTY (16 g/l triptona, 10 g/l extrato de levedura, 5 g/l NaCl, pH 7.4) ou XVM2 (NaCl 20 mM; (NH₄)₂SO₄ 10 mM; MgSO₄ 5 mM; CaCl₂ 1 mM; KH₂PO₄ 0,16 mM; K₂HPO₄ 0,32 mM; FeSO₄ 0,01 mM; frutose 10 mM; sacarose 10 mM; casaminoácidos 0,03%, pH 6.7). Quando necessário, acrescentou-se ampicilina (100µg/ml), estreptomicina (50µg/ml) ou canamicina (50µg/ml). Para o crescimento em meio sólido, adicionou-se 1,5% de ágar aos meios de cultura. Estoques de *E. coli* e *Xac* foram mantidos em 15% e 40% de glicerol, respectivamente, e armazenados a -80°C.

3.2) Vetores, construções e oligonucleotídeos

A Tabela 4 descreve os plasmídeos e a Tabela 5, as construções utilizadas. Os oligonucleotídeos estão descritos na Tabela 6 e foram sintetizados na escala de 25nmol ou 10nmol, desbloqueados e dessalinizados com exceção dos usados para mutagênese sítio-dirigida, cuja purificação foi por HPLC (Invitrogen, IDT e Exxtend).

Tabela 4: Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
pBRA	Derivado do vetor pBAD24 (promotor indutível por arabinose) (GUZMAN <i>et al.</i> , 1995), com origem de replicação pBBRMCS1, Sp ^r .	Marroquim M, Andrade M e Farah, CS, dados não publicados
pNPTS138	Replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	M. R. K. Alley
pNIC28-Bsa4	His ₆ N-terminal, sítio de clivagem para TEV, Km ^r , <i>sacB</i> , sítio de LIC para clonagem, T7 – lacO.	(Savitsky et al. 2010)

Tabela 5: Construções utilizadas

Construção	Vetor	Descrição	Referência
pLL001	pBRA	Fragmento NcoI/SalI de 580 pb contendo o gene <i>sigF</i> _{xac4128} .	Lima, L. P.
pLL002		Fragmento NcoI/SalI de 643pb contendo o gene <i>sigL</i> _{xac4129} .	Lima, L. P.
pLL003	pNPTS138	Fragmento contendo deleção em fase do gene <i>sigF</i> com sítios para HindIII e BamHI..	Lima, L. P.
pLL004	pBRA	No gene <i>sigF</i> _{xac4128} da construção pLL001, substituição da treonina 7 por ácido glutâmico (T7E).	Lima, L. P.
pLL005		No gene <i>sigF</i> _{xac4128} da construção pLL001, substituição da treonina 51 por ácido glutâmico (T51E).	Lima, L. P.
pLL006		No gene <i>sigF</i> _{xac4128} da construção pLL001, substituição da serina 149 por ácido glutâmico (S149E)	Lima, L. P.
pLL007		No gene <i>sigF</i> _{xac4128} da construção pLL001, substituição da treonina 163 por ácido glutâmico (T163E).	Lima, L. P.
pLL013	pNIC28-Bsa4	Fragmento de 876 pb contendo o domínio quinase do gene <i>pknB</i> _{xac4127} (aminoácidos A16-G296) com N-terminal His-tag.	Lima, L. P.
pLL015		Fragmento de 1185 pb contendo o domínio quinase do gene <i>pknB</i> _{xac4127} e possível N-terminal não anotado como parte do gene (68 aa a montante do M1 anotado-G296) fusionado a His-tag.	Lima, L. P.
pLL016		Fragmento de 540 pb (nucleotídeos 1 a 540) contendo o gene <i>sigF</i> _{xac4128} com N-terminal His-tag.	Lima, L. P.

Tabela 6: Oligonucleotídeos

Nome	Sequencia (5' – 3')	Gene Alvo/Utilização
XAC 4128 F	AAT CCA TGG TGT CCG AGC TGC CGA TCA	<i>sigF_{xac4128}</i> / construção pLL001
XAC 4128 R	AAA GTC GAC AAC AAG GCT TCC AAA CGT T	<i>sigF_{xac4128}</i> / construção pLL001
XAC 4129 F	AAA CCA TGG TGT CGG CAC ATC CAA AG	<i>sigL_{xac4129}</i> / construção pLL002
XAC 4129 R	AAA GTC GAC GTC AGC CAA TCC ATG AAA C	<i>sigL_{xac4129}</i> / construção pLL002
XAC 4128 F1 For	AAA AAG CTT ACG TTC GGC GAT CTG TTT	<i>sigF_{xac4128}</i> (deleção em fase de siF)/construção pLL003
XAC 4128 F1 Rer	CAG ATC GCG CTC CTG CCA GGC CTG CAA CAA CTC	<i>sigF_{xac4128}</i> (deleção em fase de siF)/construção pLL003
XAC 4128 F2 For	GAG CGC GAT CTG CGT TTT GCC A	<i>sigF_{xac4128}</i> (deleção em fase de siF)/construção pLL003
XAC 4128 F2 Rer	AAA GGA TCC ATC ATG CGC GTA GGT CAT	<i>sigF_{xac4128}</i> (deleção em fase de siF)/construção pLL003
XAC 4128 F1For2	AGG CCG CGC ACC ACG TAT TT	<i>sigF_{xac4128}</i> /confirmação de linhagem por PCR de colônia.
4128QRTFO R	AGG TGG ACG AGC GCA AAG	<i>sigF_{xac4128}</i> /RT-PCRq
4128QRTRE V	ACC GAC ACC TCC AGC TGT TC	<i>sigF_{xac4128}</i> /RT-PCRq
4129QRTFO R	CGG TGC TGG TGA TGC AGT AC	<i>sigL_{xac4129}</i> /RT-PCRq
4129QRTRE V	GCG CAC CAC GTA TTT CTT GA	<i>sigL_{xac4129}</i> /RT-PCRq
4124QRTFO R	ACG CCA AGC AGC GCA CCT ACT	<i>vgrG_{xac4124}</i> /RT-PCRq
4124QRTRE V	AGA TGC CTT CGC GTT CCA	<i>vgrG_{xac4124}</i> /RT-PCRq
4140QRTFO R	ATC CGC GAG CCG TTG TT	<i>clpV_{xac4140}</i> /RT-PCRq
4140QRTRE V	GAG CGG GTA ATA CGG AAT CG	<i>clpV_{xac4140}</i> /RT-PCRq
4147QRTFO R	GTG GAT ATC ACC TTC GAA AGC AT	<i>tssC_{xac4147}</i> /RT-PCRq
4147QRTRE V	GCG CTT CCA GCA ATT TGG	<i>tssC_{xac4147}</i> /RT-PCRq
XAC4125For	GGC GAT ACC TAT GTG CGT GAA	<i>xac4125</i> /RT-PCRq
XAC4125Re v	GCA GCA ACT GTT CGT CGA AA	<i>xac4125</i> /RT-PCRq
XAC4126For	GAC GAA TTG TCG GGT GAC	<i>PAAR_{xac4126}</i> /RT-PCRq
XAC4126Re v	AGA CAT GCA AAT CGG TCA G	<i>PAAR_{xac4126}</i> /RT-PCRq
XAC4127For	ATC AGA AGG GCG TGA TCC AT	<i>pknB_{xac4127}</i> /RT-PCRq
XAC4127Re v	TCT CGC TGA CCA GCA CGT T	<i>pknB_{xac4127}</i> /RT-PCRq
MIT8E R	AGGCCTGCAACAACCTCCTCGATCGG	<i>sigF_{xac4128}</i> - T7E/construção pLL004

	CAGCTCGGAC	
M1T8E F	GTCCGAGCTGCCGATCGAGGAGTTG TTGCAGGCCT	sigF _{xac4128} - T7E/construção pLL004
M2xac4128T 52E R	CTCGTGACCAGCTCCTCTGCCTGC AAGCCGGC	sigF _{xac4128} - T51E/construção pLL005
M2xac4128T 52E F	GCCGGCTTGCAGGCAGAGGAGCTG GTGCACGAG	sigF _{xac4128} - T51E/construção pLL005
M3xac4128S 150E R	GGCTGCCTCGGCCACCTCGAAACCC ACCAGCTC	sigF _{xac4128} - S149E/construção pLL006
M3 xac4128S150 E F	GAGCTGGTGGGTTTCGAGGTGGCCG AGGCAGCC	sigF _{xac4128} - S149E/construção pLL006
M4xac4128T 164E R	ATCGCGCTCCAGCTCCGGCACCGAC ACC	sigF _{xac4128} - T163E/construção pLL007
M4xac4128T 164E F	GGTGTCGGTGCCGGAGCTGGAGCG CGAT	sigF _{xac4128} - T163E/construção pLL007
Xac4127_for	TAC TTC CAA TCC ATG AGC CTG GCG GCC ACC	<i>pknB</i> _{xac4127} /construções pLA007 e pLA008
xac_4127_A1 6_F	TACTTCCAATCCATGGCG TGG GCG ATC GAC C	<i>xac4127</i> /construções pLA005 e pLA006
xac_4127_G2 96_R	TATCCACCTTTACTG TTA ACC GTC CAG CCA GCG ATG	<i>pknB</i> _{xac4127} /construções pLA002, pLA004, pLA006 e pLA008
xac4128_M1 _F	TACTTCCAATCCATG TCC GAG CTG CCG ATC AC	sigF _{xac4128} /construção pLA009
RpoB For	GGA TTC CTA TCG CGA ATT CCT	<i>rpoB</i> _{xac0965} /RT-PCRq
RpoB Rev	TGT AGC TGG AAA TCG GGA ACA	<i>rpoB</i> _{xac0965} /RT-PCRq
RpoC For	AGC GTG ATG GCC TGT TCT G	<i>rpoC</i> _{xac0966} /RT-PCRq
RpoC Rev	CCG CAC AGG CAT TCG TAG T	<i>rpoC</i> _{xac0966} /RT-PCRq
pXACFor	CTG TTT CTC CAT ACC CGT T	Confirmação por PCR de sigF++

3.3) Isolamento de plasmídeos, digestão com enzimas de restrição, ligação e sequenciamento.

Os plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina, como descrito em Sambroock *et al.* (2001) ou pelo uso do kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). As digestões com enzimas de restrição foram realizadas conforme especificações do fabricante (Thermo Scientific). Os fragmentos resultantes de digestão ou o DNA plasmidial extraído foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão TAE (Tris 40mM pH 7,6; ácido acético 20mM; EDTA 1mM), a coloração foi realizada com HydraGreen (ACTGene) e visualização sob luz UV. O isolamento de fragmentos de DNA foi realizado com o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). As ligações de DNA foram realizadas a temperatura ambiente, com T4 DNA ligase e tampão fornecido pelo fabricante

(Thermo Scientific). Os sequenciamentos de DNA foram feitos com o kit “BigDyeTerminator v.3.1 CycleSequencing Kit” e o sequenciador automático ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI (IQ/USP).

3.4) Transformação

As transformações de *E. coli* com plasmídeos foram realizadas por choque térmico a 42°C durante 2 minutos ou 45 segundos, seguida de recuperação das células em meio SOC (triptona 20g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 0,5g/L; KCl 2,5mM; 0,35% glicose) por 1h e plaqueamento em LB contendo o antibiótico para seleção dos transformantes.

Para o preparo de células termocompetentes para transformação foram usados dois protocolos (Sambrook & Russell 2001). No primeiro, culturas de *E.coli* crescidas por 16 horas foram diluídas 100x em meio SOB (triptona 20g/l; extrato de levedura 5g/l; NaCl 0,5g/l; KCl 2,5mM; pH 7,5). Após crescimento até fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,6$), as células foram incubadas no gelo por 15 minutos na presença de 10 mM $MgCl_2$. As células foram coletadas por centrifugação 3000 xg e ressuspensas em tampão RF1 (KCl 10 mM; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 50 mM; acetato de potássio 30 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mM; glicerol 15%, pH 5,8), seguindo-se de incubação no gelo por 15 minutos. O material foi então submetido a centrifugação 3000 xge as células coletadas foram ressuspensas em tampão RFII (MOPS 10 mM; KCl 10 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 75 mM; glicerol 15%), aliqüotadas e estocadas a -80°C.

No segundo protocolo, culturas de 100 mL de *E. coli* mantidas por 16 horas foram diluídas 1:100 em SOB e incubadas até a $OD_{600nm} = 0,45$ sendo mantidas em gelo por 10 minutos. Em seguida, as culturas foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 0,35 volumes de solução CCMB80 (KAc 10mM; Glicerol 10%; $CaCl_2$ 80 mM; $MnCl_2$ 20 mM; $MgCl_2$ 10mM) por mL de cultura inicial, sendo mantidas no gelo por 20 minutos e então coletadas por centrifugação. A massa bacteriana foi ressuspensa em 0,06 volumes de CCMB80 por mL de cultura inicial, aliqüotadas e estocadas a temperatura de -80°C.

As construções de interesse foram transferidas para *Xac* por transformação, usando a técnica de eletroporação. Células competentes foram preparadas pelo crescimento em meio CIRCLEGROW (40 g/L; Bio101 Systems – QBiogene) por 12-14 h, até atingirem $DO_{600nm} = 0,5$. As células foram então coletadas por centrifugação e lavadas três vezes em água estéril gelada. Após a última lavagem, o material foi coletado e ressuspensa em 500µL de água milliQ estéril e aliqüotado. As aliqüotas foram estocadas a -80°C. As eletroporações foram realizadas em cubetas de 0,2 cm a 2 kV, 25 µF e 200 Ω. Após a eletroporação,

adicionou-se 1 ml de meio LB em cada amostra, seguindo-se de incubação a 30°C por 4 h, com agitação. O material foi então submetido a plaqueamento em meio contendo antibiótico apropriado para seleção dos transformantes.

3.5) Construção da linhagem de superexpressão e mutante por deleção

A linhagem CM001 (Tabela 3) com deleção em fase do gene *sigF_{xac4128}* foi obtida a partir de amplificações independentes de duas regiões de 700 pb que flanqueiam *sigF_{xac4128}*, incluindo apenas as extremidades da região codificadora do gene em cada um dos fragmentos, sendo denominadas F1 e F2. Os pares de oligonucleotídeos usados foram XAC 4128 F1 For/XAC 4128 F1 Rev e XAC 4128 F2 For/XAC 4128 F2 Rev para os fragmentos F1 e F2 respectivamente (Tabela 6). Estes dois fragmentos foram usados como molde em novo PCR com uso dos oligonucleotídeos externos de cada fragmento, XAC 4128 F1 For e XAC 4128 F2 Rev, gerando, assim, um fragmento único com a deleção de 450 pb da região codificadora *sigF_{xac4128}*. Foi mantida a fase de leitura de uma pequena região codificadora com 90 pb que permaneceu. Este terceiro fragmento (F1 e F2 fusionado) foi digerido com BamHI e HindIII, clonado no vetor pNPTS138 (Tabela 4) digerido pelas mesmas enzimas dando origem a construção pLL004 (Tabela 5). Esta construção foi confirmada por sequenciamento e transformada em *Xac* por eletroporação com plaqueamento em LB sólido com canamicina para obtenção da linhagem mutante por dois eventos de recombinação homóloga, conforme descrito (Ried & Collmer 1987).

O plasmídeo pNPTS138 não se replica em *Xac*, confere resistência a canamicina e possui o gene *sacB* que codifica a enzima levansucrase. Esta enzima transforma a sacarose do meio em um produto tóxico para a célula. Portanto, os clones selecionados após a transformação foram os que apresentaram resistência a canamicina e sensibilidade a sacarose, indicando ocorrência de recombinação homóloga pela integração do plasmídeo no cromossomo. Este evento de recombinação foi confirmado por PCR. Uma segunda seleção foi feita crescendo os clones em meio 2xTY sem antibióticos e pelo plaqueamento de alíquotas em meio LB com 3% de sacarose. Para este segundo evento de recombinação, os clones selecionados foram os resistentes a sacarose e sensíveis a canamicina, indicando perda do plasmídeo juntamente com uma das cópias do gene de interesse, a selvagem ou a cópia com deleção em fase do gene. Os clones positivos para a cópia com deleção foram identificados por PCR usando-se os oligonucleotídeos XAC 4128 F1 For2 e XAC4128R.

3.6) Construção de mutantes por mutagênese sítio-dirigido

A construção pLL001, que contém o *sigF_{xac4128}* no vetor pBRA (Tabela 5) foi utilizada como molde para a construção de versões mutantes do gene em resíduos conservados de serina e/ou treonina, de forma a mimetizar um estado fosforilado da proteína SigF. Para tanto, quatro resíduos foram selecionados com base em alinhamento múltiplo de sequencias de fatores sigmas ECF43, por demonstrarem serem conservados e próximos a regiões importantes para a função do sigma. Estes resíduos foram substituídos por ácidos glutâmicos (E), usando-se o kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) e seguindo as instruções do fabricante. As construções foram verificadas por sequenciamento, conforme descrito no item 3.3.

3.7) Extração e Isolamento de RNA total

RNA total foi obtido das amostras de interesse com uso de Trizol[®] Reagent (Ambion). Para isso, amostras de 1 ml de culturas cultivadas nas condições de interesse foram centrifugadas a 16000 xg por 1 minuto em temperatura ambiente e ressuspensas em 0,5mL de Trizol. O material foi incubado por 10 minutos a 65°C, acrescentando-se, em seguida, 0,2 volumes de clorofórmio para cada mL de Trizol e incubando-se por 5 minutos a temperatura ambiente. As fases foram separadas por centrifugação em 20817 xg por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi coletada.

A purificação do RNA a partir das amostras tratadas com clorofórmio foi realizada por precipitação ou por filtração, de acordo com a técnica de análise a ser empregada posteriormente. Assim, para RNA total usado em análises de expressão relativa de genes por RT-PCR quantitativo utilizou-se a precipitação com álcool. Nesta adicionou-se 0,5 volumes de isopropanol por mL de Trizol usado inicialmente, seguindo-se de 16 horas de incubação a -80°C e centrifugação a 4°C a por 30 minutos. O material foi lavado com etanol 75% e coletado por centrifugação em 20817 xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o material foi secado a temperatura ambiente por 15 minutos e solubilizado com 70µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A outra metodologia de isolamento do RNA total a partir da fase aquosa foi feita com uso de filtro de sílica do RiboPure[™]-Bacteria Kit (Ambion[®]/Life Technologies). O RNA assim isolado foi aplicado a análise de transcriptoma por sequenciamento a partir de RNA (RNA-Seq). Assim, ao volume da fase aquosa coletado foi acrescentado 0,5 volumes de etanol 100% sendo esta mistura transferida e passada pelo filtro de sílica por centrifugação a

16000 xg por 1 minuto. Em seguida, o filtro foi lavado uma vez com 700 μ L de Wash Solution 1, depois mais 2 vezes com 500 μ L de Wash Solution e eluído com 50 μ L de Elution solution.

O RNA total foi quantificado no espectrofotômetro Epoch (Biotek) e armazenado a -80°C.

3.8) Ensaio de Patogenicidade e de Adesão a Folha

Para ambos os ensaios culturas saturadas foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ e incubadas a 30°C. Após atingirem uma $DO_{600nm} = 0,6 - 0,8$ (fase logarítima tardia de crescimento), os inóculos foram lavados e ressuspensos em 10 mM de $MgCl_2$, sendo diluídos para $DO_{600nm} = 0,1$. Para os ensaios de patogenicidade, o material foi aplicado por infiltração na superfície abaxial das folhas de laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), usando-se seringa sem agulha. Para este ensaio foram usadas três folhas de três plantas independentes. A progressão da infecção foi acompanhada e registrada periodicamente, por meio de fotografias.

Para o ensaio de adesão a folha, 20 μ L destas suspensões foram usados para aplicação em duplicata na superfície abaxial de folhas previamente higienizadas com álcool 70%. Três folhas de duas plantas independentes foram usadas para cada período de incubação. Após a aplicação, as folhas foram mantidas em câmara úmida e a adesão foi analisada nos tempos de 16 h e 72 h por coloração com cristal violeta. Para isso, as folhas foram submersas em cristal violeta 1% durante 15 minutos e, em seguida, lavadas com água corrente.

3.9) Ensaio de Formação de Biofilme

Neste ensaio inóculos saturados foram diluídos para $DO_{600nm} = 0,1$ e distribuídos em tubos de ensaio de vidro de mesmo tamanho e espessura (2 ml por tubo). Após a incubação nos tempos de interesse, as culturas foram removidas e o biofilme formado na parede dos tubos foi determinado por coloração com cristal violeta. Para isso, os tubos foram lavados 1x com água, corados por 30 minutos com 2,5 ml de cristal violeta 0,1%, sendo então lavados mais 2x com água. O biofilme foi dissolvido com etanol 70%, incubando-se por 16 horas e quantificando-se por dosagem em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Para cada tempo de incubação foi feita triplicata das amostras.

3.10) Ensaios de viabilidade em diferentes condições de crescimento e estresse

Culturas iniciais foram preparadas em 2xTY a partir de colônias em placas de LB sólido das linhagens. Depois de crescimento entre 28 – 30°C com agitação e por 16 horas, as culturas foram normalizadas para $DO_{600nm} = 0,1$. As condições de crescimento ou estresses aplicados foram:

a) em circunstâncias favoráveis de crescimento no meio de cultura 2xTY, a 28°C, sob agitação de 200 rpm, sendo o crescimento analisado pela medida da variação na turbidez das culturas a cada 2 horas de cultivo em espectrofotômetro (DO_{600nm}) e, assim, obtendo perfil de crescimento das linhagens;

b) com limitação de Ferro: as culturas foram crescidas em meio 2xTY na ausência ou presença de 300 μ M de 2,2 dipiridil e monitoramento por turbidez a cada 2 horas;

c) com ácido fítico como agente bacteriostático, pela adição de diferentes concentrações do agente (0, 1, 3, 5 e 10mM), avaliando-se o crescimento por turbidez após 5 horas de incubação;

d) em estresse por radiação UVC: após as culturas atingirem $DO_{600nm} = 0,5$, as células foram expostas a UVC em 254nm na cabine de segura biológica por 60 segundos e a viabilidade determinada por contagem de UFC/mL pelo método de diluição seriada, antes e após o estresse;

e) em presença de 4,4 mM de H_2O_2 : o agente oxidativo foi adicionado as culturas quando atingiram $DO_{600nm} = 0,5$, deixado agir durante 10 minutos e a viabilidade determinada conforme descrito para o estresse por radiação UVC;

3.11) Obtenção de amostras de RNA total de *Xac* em contato com planta hospedeira

Para determinar os níveis relativos de RNAm do *sigF_{xac4128}* e *sigL_{xac4129}* em *Xac* durante a sua interação com plantas hospedeiras, amostras de RNA total foram obtidas de culturas da linhagem selvagem crescidas na superfície (epifítico) e dentro da folha (infecção) de *Citrus sinensis* Osbeck em diferentes períodos de tempo. Para o crescimento epifítico, as folhas foram inoculadas borrifando-se a cultura em sua superfície. Para as condições de infecção foi feito um ferimento com agulha na superfície da folha e, com uma seringa sem agulha, o inóculo foi injetado por pressão. Após diferentes períodos de tempo, amostras foram coletadas e seu RNA total extraído pelo método de Trizol.

3.12) Ensaios de RT-PCR Quantitativo

O RNA total obtido conforme descrito no item 3.7 foi tratado com DNase I (ThermoScientific), seguindo recomendações do fabricante. Inicialmente, 3µg de RNA total foi tratado com 3U de DNase I em tampão correspondente durante 30 minutos a 37°C. Depois foi acrescentado EDTA na concentração final de 5mM e a enzima foi inativada por incubação a 65°C por 15 minutos. A eliminação de DNA contaminante foi confirmada por PCR convencional. Em seguida as amostras tiveram sua quantidade e qualidade avaliadas em espectrofotômetro Epoch-Biotek.

As amostras de RNA total tratadas com DNase I foram usadas para síntese de cDNA fita simples com o uso do Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Para isso, 0,5µg do RNA total tratado foram incubados com random hexamer primer por 5 minutos a 65°C e esfriados, imediatamente, em gelo. Em seguida, os demais reagentes foram adicionados e a síntese ocorreu com uma ciclagem de 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 5 minutos. Alíquotas foram usadas para performance do PCR quantitativo com SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) ou com o KAPA SYBR FAST qPCR kit master mix (2x) ABI Prism no equipamento Fast Real Time PCR System 7500 (Biosystem). O método de corrida foi: 50° por 2 minutos, 95° por 10 minutos, 95°C por 15 segundos, 63°C por 1 minuto (estes dois últimos repetidos 40x), 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95° por 15 segundos e 60°C por 15 segundos quando usado o primeiro kit citado. Para o segundo kit, a ciclagem foi: 95°C por 3 minutos, 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos, repetidos 40x nesta ordem, 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos. Os normalizadores usados foram os genes *rpoC* e *rpoB*, que codificam as subunidades betas da RNA polimerase (Jacob et al. 2011). Os oligonucleotídeos usados estão descritos na Tabela 6. O método usado para analisar os dados de qPCR foi o $2^{-\Delta\Delta C_T}$, também conhecido como Método de Livak (Livak & Schmittgen 2001) ou o método de Pfaffl (Pfaffl 2001). As eficiências dos oligonucleotídeos foram avaliadas para cada condição de amplificação obtida com os kits usados. Para isso curvas de eficiência foram geradas com concentrações decrescentes de cDNA ou DNA. Sendo validadas as condições em que os genes apresentaram $R^2 > 0,98$, eficiência entre 90% - 105% e consistência entre as reações replicadas. O método de Livak foi aplicado aos genes nas condições que apresentaram eficiências próximas a 100% e com no máximo 5% de diferença entre genes alvos e os normalizadores. O método de Pfaffl foi usado para os genes alvos com diferença maior que 5% na eficiência em relação aos normalizadores.

3.13) Isolamento de RNA e preparo de bibliotecas para análises de transcriptoma

Amostras de RNA total foram isoladas das linhagens WTp, *sigF⁺⁺*, *sigF⁺⁺T51E* e *sigL⁺⁺* cultivadas até OD_{600nm} de ~0,5 em meio de cultura 2xTY a temperatura de 28°C sob agitação de 200 rpm. Apenas para WTp, *sigF⁺⁺* e *sigF⁺⁺T51E* foi realizada a extração de RNA total após a adição e incubação com indutor L-arabinose por 30 minutos. Para fins de comparação com *sigL⁺⁺*, foi extraído RNA total também de WTp sem adição de L- arabinose. A extração do RNA total foi feita conforme descrito no item 3.7. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNA-free™ kit (Ambion®/Life Technologies), conforme descrito no manual do fabricante. Sendo, posteriormente, verificada por PCR a contaminação por DNA.

A qualidade do RNA total foi analisada pelo 2100 Bioanalyzer usando o Prokaryote Total RNA Pico (Agilent Technologies). O RNAm foi enriquecido do RNA total das amostras a partir da depleção do RNAr e RNAt usando o Ribo-Zero Gram-Negative Bacteria rRNA Removal Kit (Illumina). Uma nova análise da qualidade foi então realizada no 2100 Bioanalyzer. A partir desta etapa, os procedimentos foram realizados no laboratório da Professora Regina Lúcia Baldini (IQ/USP), com participação da pós-doutoranda Dra Ana Laura Boechat Borges com experiência em preparo de bibliotecas para RNA-seq.

Com as amostras de RNAm obtidas, foram geradas as bibliotecas de cDNA usando o TruSeq RNA Library Preparation LT v2 (Illumina). As bibliotecas foram validadas através da análise pelo 2100 Bioanalyzer usando o Agilent DNA 1000 kit (Agilent Technologies) e quantificada pelo KAPA Library Quantification Kit Illumina platforms (KAPA Biosystems).

As bibliotecas foram normalizadas para 4nM e entregues na facility GENIAL (ICB-USP) para sequenciamento no equipamento NextSeq com uso do NextSeq 500/550 Mid Output v2 kit (150 cycles, 2x75) sendo geradas reads paired-end.

Os dados obtidos do sequenciamento foram analisados em colaboração com o laboratório do Departamento de Bioquímica da USP-Ribeirão Preto pela Profa. Dra. Tie Koide e doutorando Alan Lorenzetti (FMRP/USP). Na análise dos dados, genes com *p-value* ajustado (padj) <0,1 e *Log2 Fold Change* ≥1 foram considerados diferencialmente expressos.

3.14) Expressão e Purificação das Proteínas SigF e PknB

Foram obtidas construções com fusões de tradução dos genes *sigF_{xac4128}* e *pknB_{xac427}* no vetor pNIC28-Bsa4 (Tabela 4, para descrição do vetor e Tabela 7, para

informações das construções com este plasmídeo). Este vetor tem um promotor induzível por IPTG e produz uma fusão das proteínas de interesse com 6 resíduos de histidina na extremidade N-terminal. Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR a partir do DNA cromossomal de *Xac*, com uso de oligonucleotídeos contendo a 5' uma sequência de extensão para clonagem LIC (sítio LIC). Estes fragmentos foram inseridos no vetor por clonagem independente de ligação (Eschenfeldt et al. 2009; Savitsky et al. 2010). Resumidamente, os sítios de LIC foram expostos em fita simples no vetor e nos fragmentos pela atividade de exonuclease 3'-5' da T4 DNA polimerase. Depois fragmentos e vetor foram anelados por incubação durante 10 minutos a 37°C e mais 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a transformação das reações em DH5 α , com posterior confirmação dos clones por PCR de colônia e sequenciamento, conforme descrito em itens anteriores. Após confirmação, os plasmídeos foram isolados e, em seguida, transformados em duas cepas para expressão *E. coli*: BL21(DE3)-R3-lambda-PPase e BL21(DE3)-R3-pRARE2 (Tabela 2). Os tamanhos esperados para as proteínas recombinantes podem ser conferidos na tabela a seguir.

Tabela 7. Construções para Expressão e Purificação SigF e PknB

#	Construção	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho do fragmento de PCR (bp)	Vector	Nº de aminoácidos*	Peso molecular (Da)*
1	pLL008	xac_4127_L1_F	xac_4127_R316_R	978	pNIC28-Bsa4	338	37266.44
2	pLL009	xac_4127_L1_F	xac_4127_G296_R	918	pNIC28-Bsa4	318	34740.45
3	pLL010	xac_4127_G11_F	xac_4127_R316_R	951	pNIC28-Bsa4	328	36190.12
4	pLL011	xac_4127_G11_F	xac_4127_G296_R	891	pNIC28-Bsa4	308	33664.13
5	pLL012	xac_4127_A16_F	xac_4127_R316_R	936	pNIC28-Bsa4	323	35617.54
6	pLL013**	xac_4127_A16_F	xac_4127_G296_R	876	pNIC28-Bsa4	303	33145.55
7	pLL014	xac4127_for	xac_4127_R316_R	1185	pNIC28-Bsa4	406	44532.75
8	pLL015**	xac4127_for	xac_4127_G296_R	1125	pNIC28-Bsa4	386	42006.76
9	pLL016**	xac4128_M1_F	xac_4128_L179_R	567	pNIC28-Bsa4	201	22463.53

*Este peso molecular corresponde a somatória do peso molecular da construção mais a da cauda de hexahistina.

**Construções usadas para expressão em larga escala e ensaios de fosforilação.

Após a obtenção das linhagens, a expressão das proteínas recombinantes em resposta a adição de IPTG foi analisada através de experimentos em pequena escala. Para isso, culturas saturadas de transformantes de *E. coli* com as construções de interesse foram diluídas cerca de 100x em meio de cultura TB (Tryptona 1,2%; Extrato de levedura 2,4%; glicerol 0,4%; K_2HPO_4 72mM e KH_2PO_4 17mM) com canamicina e incubadas a 37°C sob agitação até atingirem DO_{600nm} de 2-3. As culturas foram induzidas com 1mM de IPTG e incubadas com agitação por mais 5 horas a 37°C. Alíquotas de 1mL foram retiradas antes e depois da adição do indutor e coletadas por centrifugação. As células foram ressuspensas em tampão de amostra de proteínas (Tris-HCl 62,5mM pH6,8; glicerol 6,25%; SDS 1%; azul de bromofenol 0,01%) na proporção de 40 μ L para cada A_{600} 5. Estas amostras foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

Para a produção das proteínas recombinantes em larga escala, culturas saturadas foram diluídas 100x em 1,5L de meio de cultura TB com canamicina e incubadas a 37°C sob agitação até DO_{600nm} de 2-3 e então induzidas com 0,5mM de IPTG durante 18 horas a 18°C sob agitação. A cultura foi coletada, centrifugada e ressuspensa em tampão de Afinidade 2x (HEPES 100mM, pH 7,5; NaCl 1,0 M; glicerol 20%; imidazol 20 mM e TCEP 1 mM) e 1x(HEPES 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M, glicerol 10%; imidazol 10mM e TCEP 0,5mM). As células foram lisadas por sonicação. A fração solúvel (sobrenadante) foi clarificada por centrifugação a 40.000xg por 45 minutos e a 4°C. As proteínas recombinantes foram purificadas usando a HisTrap FF (5mL de resina Ni-sepharose, GE Healthcare) equilibrada com tampão de afinidade 1x e eluídas com 300mM de imidazol em tampão de afinidade. Em seguida, as amostras foram purificadas em coluna Superdex S200 (GE Healthcare) equilibrada com HEPES 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,5M, glicerol 5%; e TCEP 1 mM. Ao longo da purificação, alíquotas foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE. As proteínas purificadas foram quantificadas por absorbância em 280nm e concentradas usando Amicon Ultra (Millipore).

Quando aplicável, a cauda de hexahistidina foi removida pela incubação com a protease TEV (tobacco etch vírus) em razão molar entre 1:20 – 1:40 da enzima para a proteína alvo. Esta enzima cliva em uma sequência entre a cauda de histidina e a proteína alvo (ENLYFQ*S). A digestão pela TEV ocorreu por cerca de 16 horas a 4°C. Depois deste período de incubação, foi feita uma segunda passagem pela resina de Ni-sepharose, sendo coletada a fração da purificação de proteínas não ligadas à resina de níquel.

3.15) Ensaio de Fosforilação *in vitro*

Em um volume total de 20 μ L de reação, o substrato (SigF_{xac4128}) foi diluído para 45 μ M em tampão HEPES 50mM (pH 7,5), MgCl₂ 5mM, ATP 1mM, TCEP 0,5mM. As versões do domínio quinase de *xac4127* purificadas, PknB_{xac4127-cb006} e PknB_{xac4127-cb008}, foram adicionadas nas concentrações de 7,65 μ M e 5.23 μ M, respectivamente, e, para a reação controle sem domínio quinase, foi acrescentado o volume correspondente de tampão. Duas outras reações foram feitas com estas mesmas construções, porém, em uma concentração 100x menor.

Para ensaios de autofosforilação da quinase PknB_{xac4127}, as reações foram preparadas sem a adição do substrato, com ou sem ATP. A concentração de PknB_{xac4127-cb006} foi de 153nM e 105nM para a PknB_{xac4127-cb008}.

Todas as reações foram incubadas a 37°C por 1 hora. Alíquotas de 1 μ L foram coletadas antes e depois da incubação e 59 μ L de ácido fórmico 0,1% foi adicionado. Estas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a análise em espectrômetro de massas LC/MSD TOF, do inglês “electrospray ionization time-of-flight spectrometer”.

Tanto para este como para o item anterior, “3.14) Expressão e Purificação das Proteínas SigF e PknB”, contamos com a expertise e colaboração dos pesquisadores do Centro de Pesquisas SGC (Structural Genomics Consortium), localizada na Unicamp.

4) RESULTADOS

4.1) Construção das linhagens

Para a caracterização funcional do fator sigma codificado pelo gene anotado como *xac4128* (*sigF*), foi obtida uma linhagem mutante ($\Delta sigF$, CM001) (perda de função) e uma linhagem com níveis aumentados do gene em questão (*sigF⁺⁺*, WT/pLL001) (ganho de função). A linhagem $\Delta sigF$ foi obtida por deleção em fase do gene, substituindo-se a cópia selvagem no cromossomo da bactéria pela versão contendo a deleção. A linhagem *sigF⁺⁺* foi obtida pela clonagem do gene no vetor multicópia pBRA (Figura 11. Mapa do vetor pBRA e esquematização das amplificações dos genes *sigF* e *sigL*.e Tabela 4) (Marroquim M, Andrade M e Farah, CS, dados não publicados), derivado do plasmídeo pBAD24, que possui promotor induzível por arabinose (Guzman et al. 1995). Uma linhagem super-expressando *sigL* também foi obtida, através da clonagem deste gene no vetor pBRA (*sigL⁺⁺*, WT/pLL002) (Figura 11B). Os clones confirmados foram transferidos para *Xac* e a presença da cópia extra foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos para o vetor pBRA (Figura 11C).

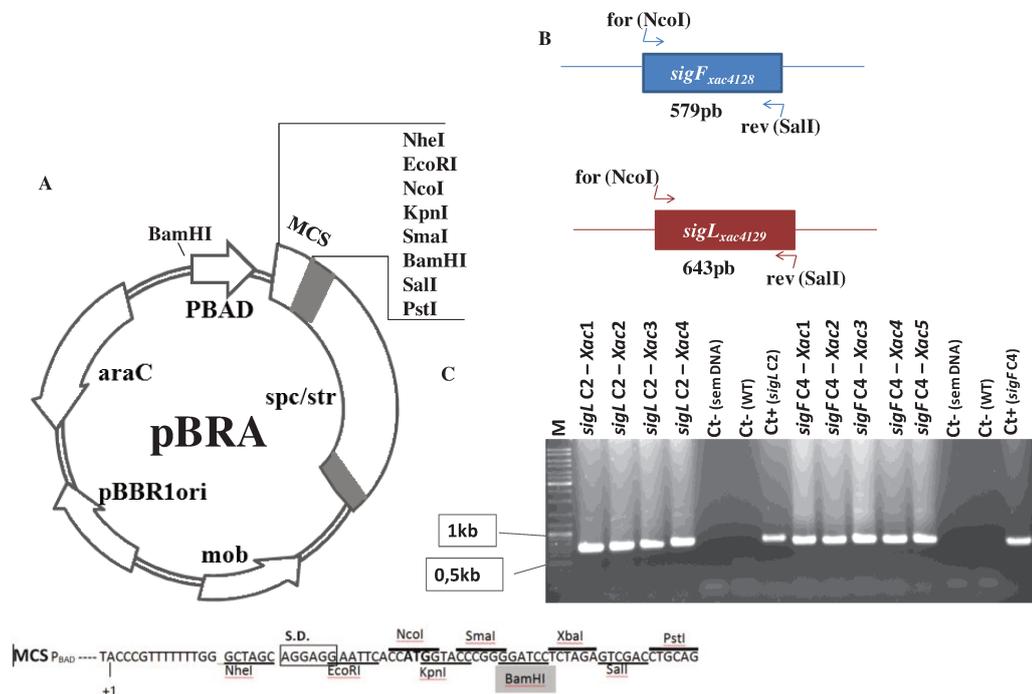


Figura 11. Mapa do vetor pBRA e esquematização das amplificações dos genes *sigF* e *sigL*.

(A) Vetor pBRA com detalhes do sítio múltiplo de clonagem, indicado por MCS, do inglês multiple cloning site; +1, início de transcrição; S.D, sequencia Shine-Delgarno ou sítio de ligação ao ribossomo; spc/str, gene de resistência a espectinomicina/estreptomicina; mob, mobilizável, codifica elementos que permitem sua transferência por conjugação; pBRR1ori, origem de replicação; araC, ativador da expressão do promotor BAD; pBAD, promotor indutível por L-arabinose. (B) Esquema das amplificações dos genes *sigF* e *sigL* para clonagem no vetor pBRA: for, primer forward; rev, primer reverse com sítio para SalI (C) Análise por eletroforese em gel

de agarose 1% após PCR de colônia de transformantes das construções pLL001 e pL002 em *Xac*. Os fragmentos de interesse possuem cerca de 100 pb a mais porque um dos oligonucleotídeos utilizado (pXAC For, Tabela 6) anela no vetor pBRA. Desta forma, é possível identificar apenas a cópia dos genes presente no vetor e não a cópia selvagem presente no cromossomo.

Para a construção da linhagem com deleção do gene *sigF*_{*xac4128*} foi realizada amplificação a partir do DNA genômico de *Xac* das regiões de 780 e 737 pb que flanqueiam *sigF*_{*xac4128*}, incluindo apenas poucos pares de bases de cada uma das extremidades da região codificadora do gene (Figura 12). Estas duas regiões foram fusionadas por PCR de forma a obter-se um fragmento contendo a deleção de grande parte da região codificadora do gene. A construção assim obtida representa a deleção de 450 pb da região interna do gene (150 aminoácidos), mantendo apenas 42 pb (14 aminoácidos) da região 5' e 48pb (16 aminoácidos) da região 3' codificadora. O fragmento com deleção foi clonado no vetor suicida pNPTS138 em *Xac* e a cópia selvagem do gene de interesse foi, então, substituída pela cópia contendo a deleção em fase, através de dois eventos de recombinação homóloga na linhagem selvagem de *Xac*, conforme descrito em Ried & Collmer, 1987 (detalhes em Material e Métodos) (Figura 12).

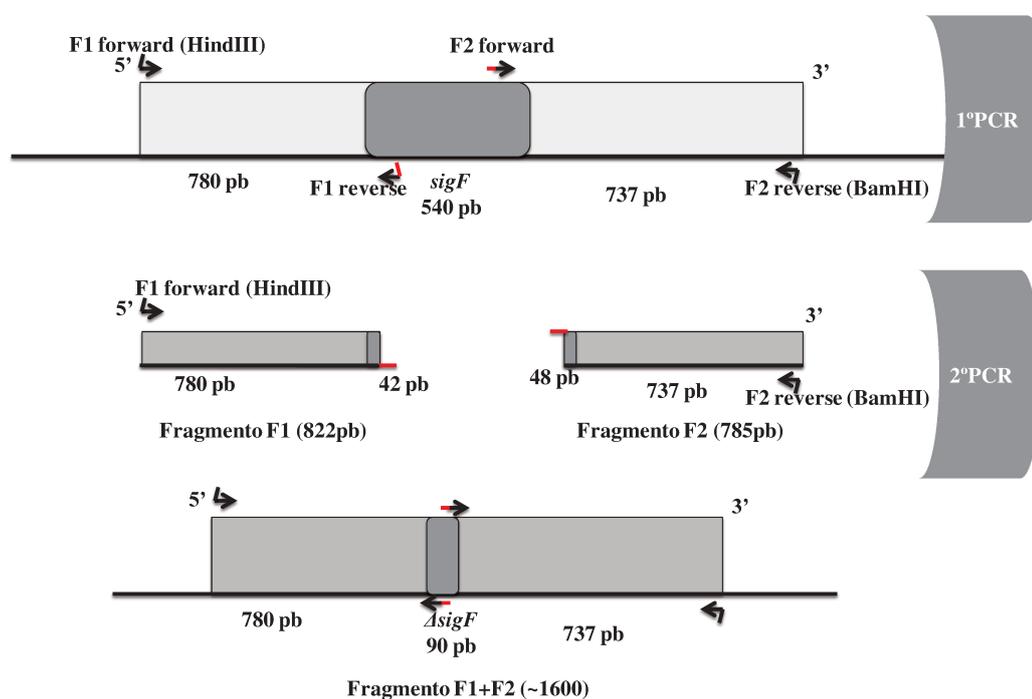


Figura 12. Obtenção da construção pLL003.

Esquema representativo da obtenção da construção pLL003 para a linhagem com deleção em fase do *sigF* (CM001). Os retângulos em cinza escuro e claro representam a região codificadora de *sigF* e os segmentos que a flanqueiam, respectivamente. As setas representam os oligonucleotídeos usados. A parte na cor vermelha nas setas e linhas indicam região complementar ao F2 forward inserido no F1 reverse para a junção por PCR.

O plasmídeo pNPTS138 possui gene para resistência a canamicina e ainda o gene que codifica para a levansucrase (*sacB*), enzima que catalisa a conversão da sacarose

adicionada ao meio em um produto tóxico para a célula. Assim, colônias resultantes da primeira recombinação, que promove a inserção da versão mutante de *sigF* e do plasmídeo pNPTS138 no genoma de *Xac* foram selecionadas pela resistência a canamicina e sensibilidade a sacarose e confirmadas por PCR para a presença das duas cópias do gene (Figura 13)

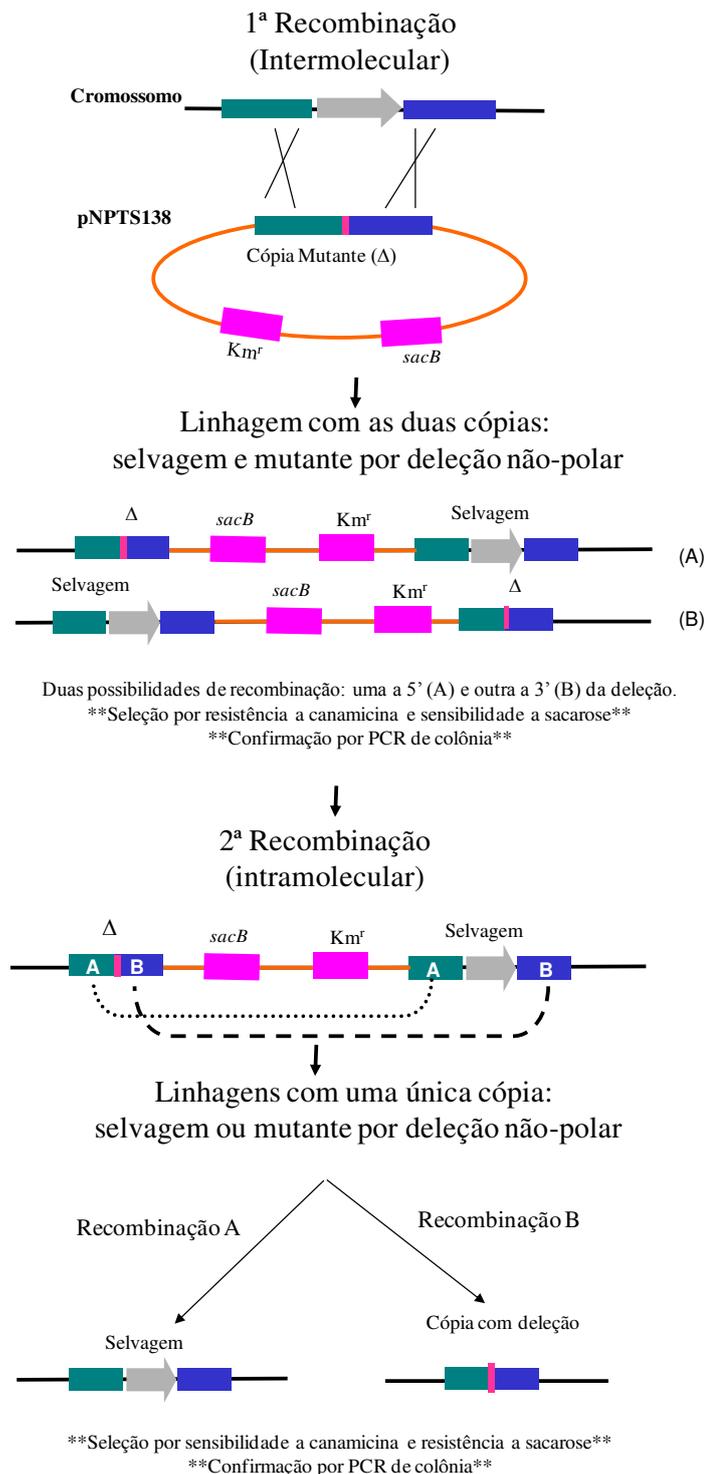


Figura 13. Representação esquemática da obtenção do mutante por deleção em fase.

(Adaptado de Gao et al. 2006).

A partir de colônias obtidas na primeira recombinação foram selecionadas linhagens que sofreram um segundo evento de recombinação, perdendo o plasmídeo e uma das cópias do gene. Assim, colônias foram selecionadas pela resistência à presença de sacarose no meio de cultura e sensibilidade a canamicina. Na segunda recombinação pode haver dois tipos de linhagens: aquelas que perderam o plasmídeo e mantiveram, como cópia única no cromossomo, a versão selvagem de *sigF*; e aquelas que, ao eliminar o plasmídeo, perderam a cópia selvagem junto com o vetor e permaneceram com a cópia mutante no cromossomo (Figura 14A). Sendo assim, as colônias selecionadas foram submetidas à análise por PCR para verificar quais possuíam a cópia mutante (Figura 14).

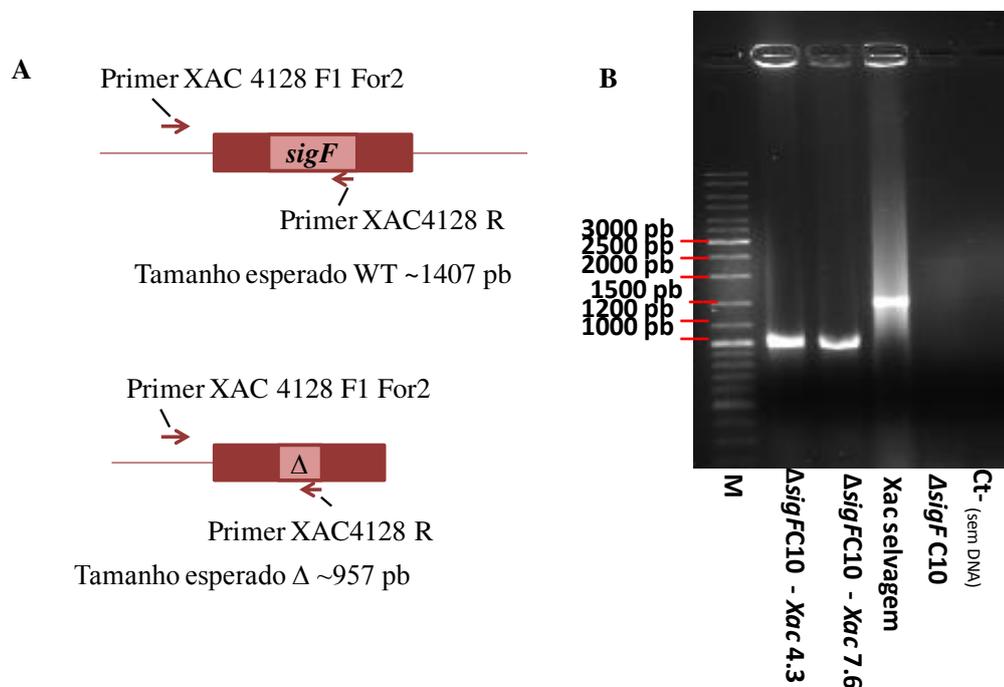


Figura 14. Segundo evento de recombinação (intramolecular).

(A) Esquema da amplificação para confirmação dos clones com cópia mutante por deleção em fase no gene *sigF* após o segundo evento de recombinação. O retângulo em vermelho representa a região clonada no vetor pNPTS138. (B) Análise de PCR de colônia por eletroforese em gel de agarose 1%. M: Marcador de peso molecular O'GeneRuler DNA ladder (Thermo Scientific); $\Delta sigFC10 - Xac4.3$ e $\Delta sigFC10 - Xac7.6$: clones $\Delta sigFC10 - Xac4$ e $\Delta sigFC10 - Xac7$ após segunda recombinação; Xac selvagem: amplificação da cópia selvagem do fragmento a partir de PCR de colônia da Xac306; $\Delta sigFC10$: clone em DH5a confirmado com a construção pLL003; Ct-: Controle negativo.

4.2) Caracterização Funcional de SigF: Papel na Resposta a Estresses Ambientais e na Interação com Plantas Hospedeiras

4.2.1) Perfil de Crescimento em condições padrão de cultivo

As linhagens construídas $\Delta sigF$ (CM001), $sigF^{++}$ e $sigL^{++}$ foram submetidas a uma caracterização inicial em condições ótimas de crescimento, pela determinação do seu perfil de crescimento em comparação ao apresentado pelas cepas parentais. No caso das linhagens para super-expressão foi utilizada como controle a linhagem selvagem (*Xac306*) contendo o vetor vazio pBRA (WT/pBRA). O crescimento foi analisado pela medida da variação na turbidez das culturas a cada 2 horas de cultivo em espectrofotômetro (DO_{600nm}).

Uma vez que o vetor pBRA tem um promotor com atividade induzida pela presença de L-arabinose, as linhagens foram submetidas a duas condições diferentes: uma contendo 0,3% do indutor arabinose e a outra, glicose. O promotor presente no vetor pBRA tem atividade reprimida pela presença de glicose em *E. coli* (Guzman et al. 1995) e foi possível observar através de imunoblot com proteínas expressas a partir deste vetor que o mesmo ocorre em *Xac* (dados do laboratório, não publicados). A Figura 15 mostra o resultado obtido.

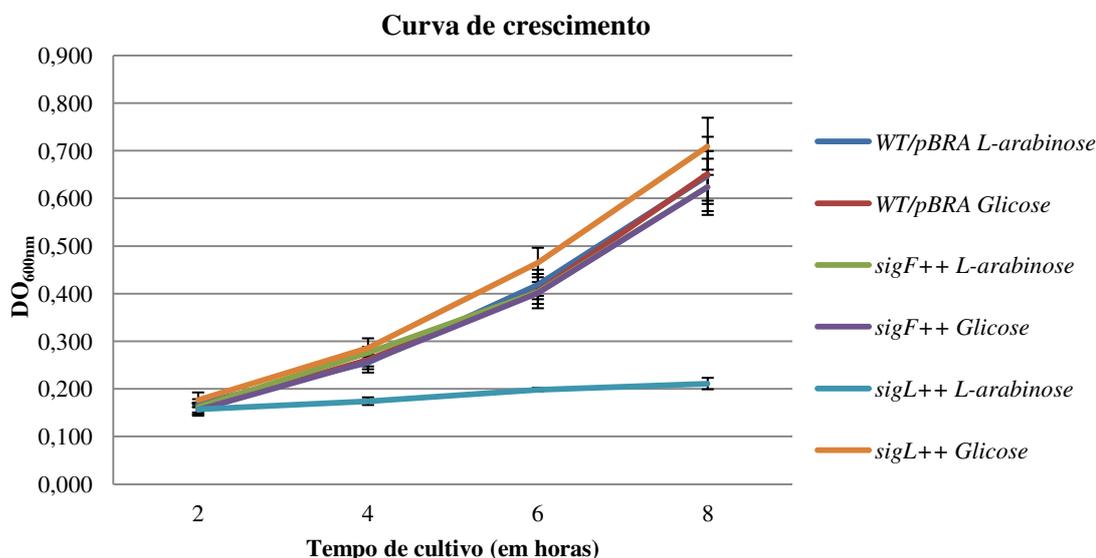


Figura 15. A super-expressão de *xac4129* impede o crescimento de *Xac*.

Curva de crescimento das linhagens com vetor para super-expressão de *sigF* e *sigL*. Inóculos saturados foram diluídos para $DO_{600nm} = 0,1$ em meio 2xTY na presença de 0,3% de L-arabinose ou Glicose. Em intervalos de 2 horas alíquotas foram retiradas para determinação de crescimento pela medida de DO_{600nm} . O gráfico representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais representam o erro padrão.

Os perfis de curva de crescimento apresentado pela linhagem que super-expressa *sigF*, em ambas as condições, são idênticos aos apresentados pelas amostras da estirpe

selvagem. Curiosamente, a linhagem que super-expressa o gene *sigL_{xac4129}* não apresentou crescimento significativo quando cultivada na presença de L-arabinose, pois a DO_{600nm} 0,2 não é ultrapassada durante todo o período de incubação (Figura 15). Além disto, o crescimento segue o padrão da cepa parental quando o ensaio é realizado na presença de glicose, indicando que o efeito depende de expressão induzida do gene *sigL_{xac4129}*. Este resultado demonstra que a super-expressão do gene *sigL_{xac4129}* leva a alterações significativas na fisiologia de *Xac*, impedindo seu crescimento.

O crescimento da linhagem mutante em *sigF* (CM001) também foi comparado a linhagem selvagem, com o objetivo de testar se o gene é importante para o crescimento da bactéria em condições padrão de cultivo. Esta linhagem foi incubada em dois diferentes meios de cultivo: 2xTY e XVM2. Este último meio promove a indução de genes de virulência, o que sugere que mimetize as condições nutricionais que o patógeno *Xac* encontra no hospedeiro, (Astua-Monge et al. 2005). A Figura 16 mostra o perfil de crescimento obtido, podendo-se verificar que a cepa mutante não possui variações significativas em seu crescimento quando comparada a linhagem selvagem.

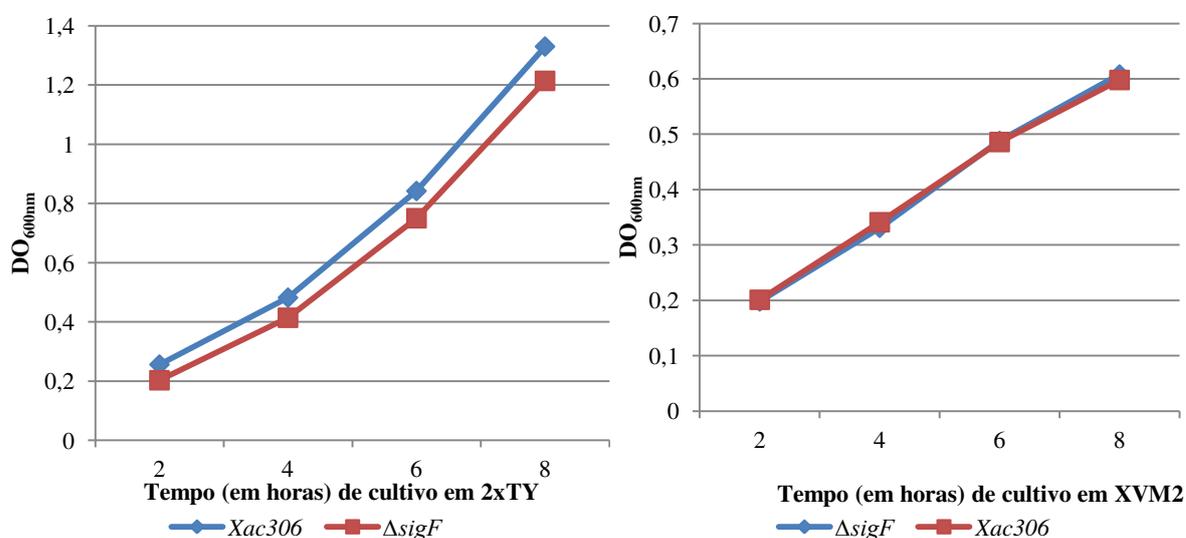


Figura 16. A ausência de *sigF* não afeta o crescimento de *Xac* nos meios de culturas 2xTY e XVM2.

Curvas de crescimento da linhagem mutante CM001 ($\Delta sigF$) em comparação a linhagem selvagem (*Xac306*). Inóculos saturados foram diluídos para $DO_{600nm} = 0,1$ em meio 2xTY ou XVM2 e alíquotas foram retiradas em intervalos de 2h para determinação de crescimento pela medida de DO_{600nm} . Os gráficos demonstram resultado de uma réplica biológica.

4.2.2) Crescimento em Resposta a Carência de Metais

Dois compostos quelantes de metais foram utilizados para verificar se *sigF* desempenha papel em condições de crescimento de deficiência nutricional: o ácido fítico e o outro, 2,2 dipiridil.

O ácido fítico, ou fitato, é um composto orgânico que representa uma importante fonte de fósforo nas plantas. Foi mostrado por WEBER *et. al.*(2014), que este composto pode atuar como agente bacteriostático em *Legionella pneumophila*, devido a sua atividade quelante de metais como ferro, cálcio e zinco. Além disto, a inibição ocorre de maneira dose-dependente em *L. pneumophila*, mas, ao superexpressar a fitase LppA (enzima com atividade de fosfatase) secretada pelo SSIV nesta bactéria, a inibição é diminuída (Weber et al. 2014). Verificamos que o gene *xac4132* codifica uma fosfatase ácida e está próximo ao gene *sigF*. Assim, ensaios foram realizados para investigar se o ácido fítico poderia agir como um agente bacteriostático para *Xac* e se *sigF* teria papel na resposta a deficiência dos micronutrientes minerais citados, através da regulação da expressão e/ou secreção da fitase pelo SSVI.

Assim, o crescimento de *Xac306* e da linhagem $\Delta sigF$ em meio 2xTY suplementado com concentrações crescentes de ácido fítico foi monitorado pela variação na turbidez da cultura (DO_{600nm}) após 5 horas de crescimento. Os resultados obtidos demonstram que *Xac306* e $\Delta sigF$ sofrem inibição progressiva no crescimento em função da concentração de ácido fítico na cultura (Figura 17). Observa-se também que a concentração de 10 mM inibe por completo o crescimento. WEBER *et. al.* (2014) demonstraram que a inibição de crescimento se dá pela atividade quelante de micronutrientes, uma vez que a atividade inibitória é revertida com a suplementação de micronutrientes minerais ou com a retirada do ácido fítico do meio de cultivo. Os resultados deste ensaio demonstram que *sigF* não é essencial para a resposta à atividade inibitória do ácido fítico em *Xac* (Figura 17). Foi também realizado um ensaio com as linhagens que super-expressam *sigF* e *sigL*, utilizando-se 0, 3, 5 e 10 mM de ácido fítico e observamos o mesmo perfil de inibição verificado na linhagem selvagem (dados não mostrados).

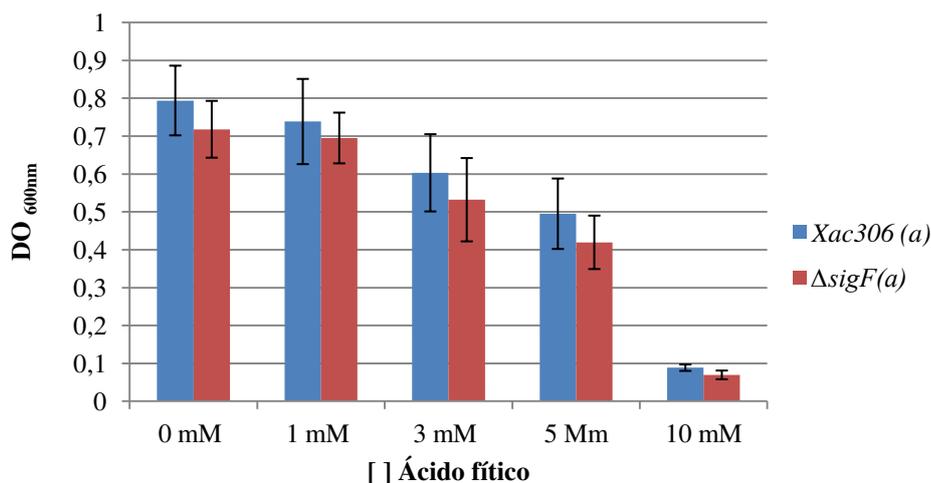


Figura 17. Inibição do crescimento de *Xac306* e $\Delta sigF$ por ácido fítico.

Culturas saturadas foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ em meio 2xTY contendo diferentes concentrações de ácido fítico, conforme indicado na figura. O crescimento foi determinado após 5 h de cultivo, através da variação na turbidez das culturas, pela DO_{600nm} . O gráfico representa a média de dois experimentos independentes. As barras verticais representam o erro padrão. Entre parêntesis: letras iguais indicam amostras ou tratamentos não diferentes estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

Para verificar se o SigF é importante em condições de limitação de ferro apenas, *Xac306* e a $\Delta sigF$ foram cultivadas em meio de cultura 2xTY acrescido ou não de $300\mu M$ de 2,2'-dipiridil. Esta substância é um quelante de alta afinidade por ferro. A carência de ferro é um dos sinais que desencadeia a indução de genes de virulência em bactérias patogênicas e o *cluster* vizinho a *sigF* codifica componentes de uma via de resposta a carência de ferro que envolve o fator SigL, do subgrupo FecI (Figura 10). O gráfico da Figura 18 mostra os resultados oriundos destes ensaios, obtidos pelo acompanhamento da densidade óptica das culturas a cada duas horas. A diferença no crescimento começa a aparecer depois de 4 horas de cultivo. Isto se deve, provavelmente, ao uso de meio de cultura complexo e muito rico em nutrientes, e, desta forma, a quantidade de quelante de ferro adicionado não deve ser suficiente para capturar todo o ferro disponível nas primeiras horas de cultivo. Conforme a densidade bacteriana aumenta o consumo de nutrientes é aumentado e a diferença é evidenciada para ambas as linhagens. Assim, as que estão em meio com 2,2 dipiridil não conseguem crescer de forma exponencial como as que não estão com limitação de ferro. Quanto a comparação entre o perfil de crescimento das linhagens na carência de ferro, não se observou diferenças entre $\Delta sigF$ e a linhagem selvagem, demonstrando que SigF não é essencial para a resposta a carência de ferro.

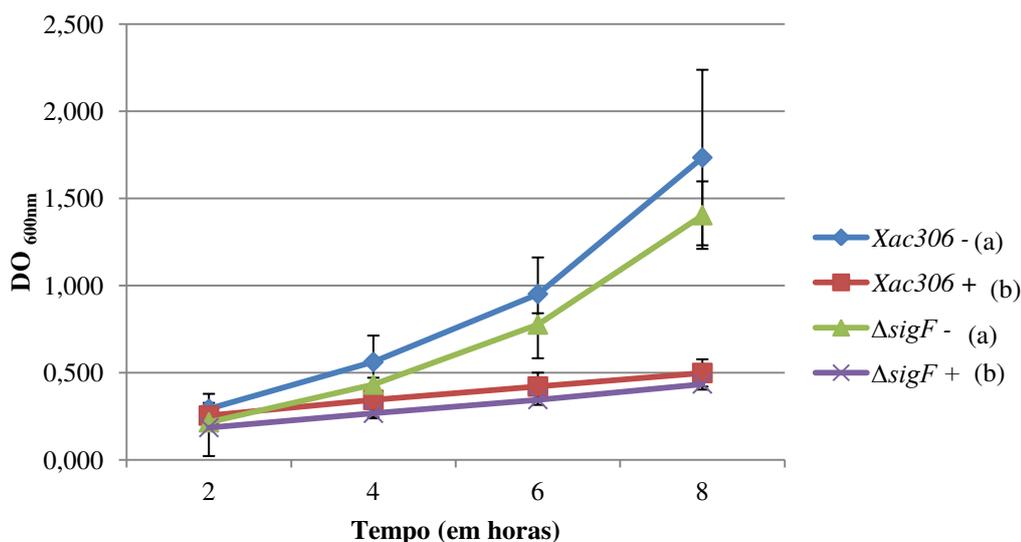


Figura 18. Crescimento de *Xac306* e $\Delta sigF$ em carência nutricional de ferro.

Culturas saturadas foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ em meio 2xTY contendo ou não 300 μM de 2,2'-dipiridil e alíquotas foram retiradas em intervalos de 2h para determinação de crescimento pela medida de DO_{600nm} . O gráfico representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais representam o erro padrão. Entre parêntesis: letras iguais indicam amostras ou tratamentos não diferentes estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Mann-Whitney ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.3) Ensaio de Patogenicidade e Formação de Biofilme em Superfícies Bióticas e Abióticas

O papel de $sigF_{xac4128}$ na patogenicidade de *Xac* foi testado, por meio de ensaios de infecção em plantas hospedeiras. Os ensaios foram realizados por inoculação de culturas de cada linhagem no interior das folhas pelo uso de seringa sem agulha. Para isso, as linhagens $\Delta sigF$ e $sigF^{++}$ foram testadas, observando-se o desenvolvimento da infecção destas em comparação com o que é apresentado pela cepa selvagem. Conforme demonstra a Figura 19, as linhagens com deleção ou a super-expressão de $sigF$ não apresentaram alterações no perfil de sintomas em comparação as linhagens parentais, uma vez que não se observou diminuição, aumento, aceleração ou retardo dos sintomas de infecção. Logo, SigF não tem papel no processo de infecção dentro da folha da planta hospedeira.

Outro possível papel deste fator sigma na interação com a planta hospedeira seria na aderência à superfície foliar, uma vez que nos ensaios de patogenicidade as linhagens foram injetadas no interior do tecido. Em virtude disto, ensaios de aderência *in planta* foram executados. Para estes ensaios, as suspensões bacterianas em fase de crescimento exponencial foram aplicadas na superfície de folhas e as bactérias aderidas após incubação por 16 e 72 hs foram quantificadas por coloração com cristal violeta. Conforme pode ser visto na Figura 19, não foi observada nenhuma diferença entre a aderência a superfície foliar das linhagens

mutante e de super-expressão com acepa selvagem. Estes resultados indicam que o fator sigma SigF não exerce papel essencial neste aspecto da fisiologia de *Xac*.

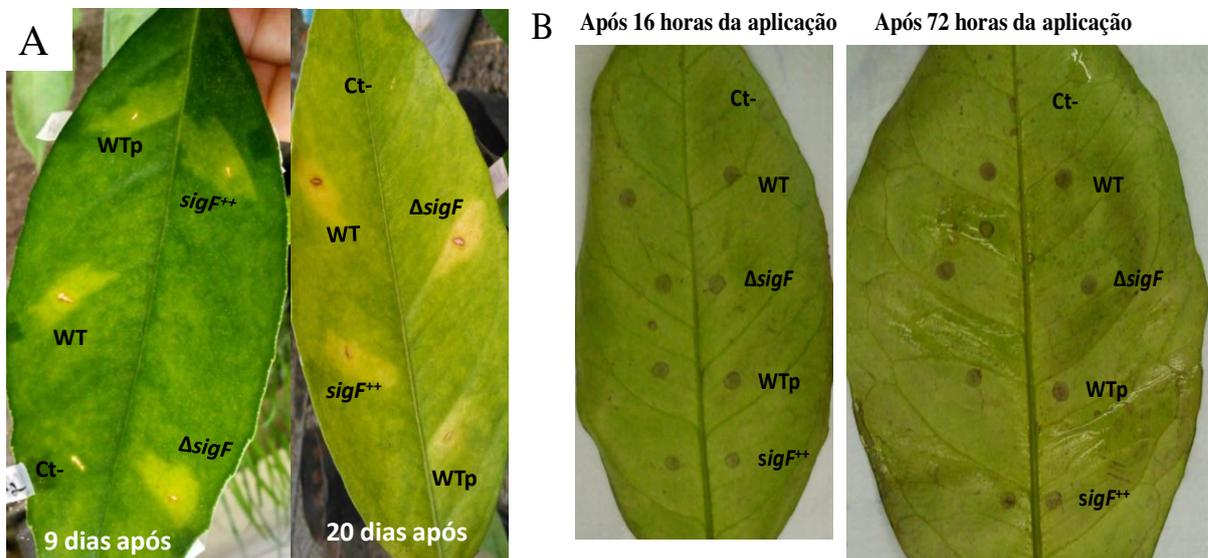


Figura 19. Estudo do Papel de σ^F Interação com Plantas Hospedeiras.

(A) Ensaio de Patogenicidade em folhas de laranja-pêra. Culturas em fase de crescimento logarítima tardia foram inoculadas por infiltração pelo uso de seringa sem agulha na superfície abaxial de folhas e monitoradas periodicamente para análise do desenvolvimento dos sintomas. (B) Ensaio de aderência a folhas de laranja-pêra. Culturas em fase logarítima tardia foram inoculadas sobre a superfície de folhas com auxílio de pipeta e, nos tempos indicados, folhas foram coletadas para quantificação da aderência por coloração com cristal violeta. Legenda: Ct-, controle negativo (solução 10 mM de MgCl₂ sem bactéria); WT, local de aplicação da suspensão da linhagem selvagem *Xac*306; WTp, WT/pBRA; sigF⁺⁺, WT/pL001; ΔsigF, linhagem CM001.

Um possível papel de SigF na capacidade de aderência e formação de biofilmes em superfícies abióticas também foi testado, por ensaios realizados em tubos de vidro. Não foram verificadas diferenças no perfil de formação de biofilmes quando as linhagens ΔsigF e sigF⁺⁺ foram comparadas com a linhagem selvagem (Figura 20).

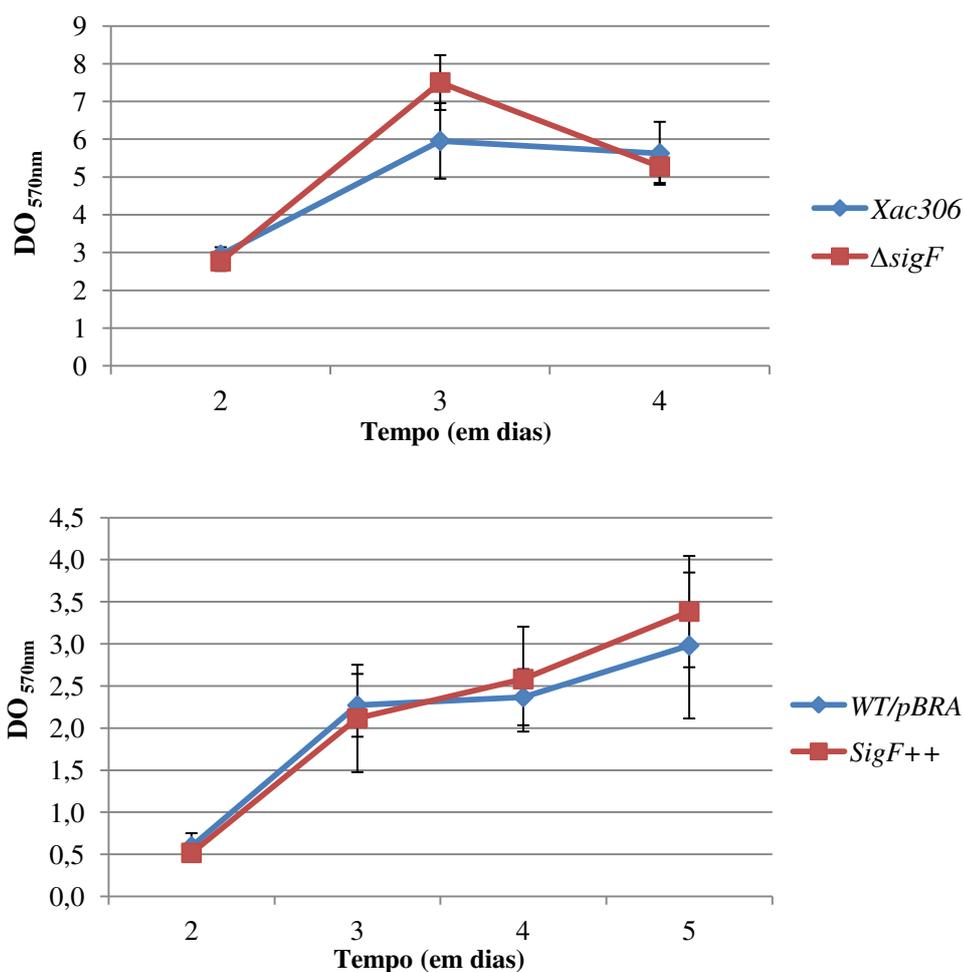


Figura 20. Aderência e formação de biofilme de $\Delta sigF$ e $sigF^{++}$.

Culturas saturadas foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ em meio 2xTY, distribuídas em tubos de vidro de mesma espessura e incubados sem agitação a temperatura ambiente. Amostras em triplicatas foram coletadas em diferentes dias conforme indicado em cada gráfico, processadas de acordo com a descrição em Material e Métodos, coradas com 0,1% de cristal violeta e a formação de biofilme foi medida em espectrofotômetro em $DO=570nm$. Para a $\Delta sigF$ foram realizados 6 ensaios e 4 para a $sigF^{++}$. Xac306, linhagem selvagem; WT/pBRA, linhagem selvagem com plasmídeo pBRA vazio; $sigF^{++}$, WT/pL001; $\Delta sigF$, linhagem CM001.

Os resultados de ensaios funcionais na interação com plantas hospedeiras foram corroborados por dados de expressão relativa do RNAm de *sigF*. Assim, ensaios de RT-PCR quantitativo demonstraram que *sigF* não sofre aumento ou diminuição em seus níveis de expressão em amostras coletadas ao longo do processo de infecção que ocorre no mesófilo foliar (Figura 21A). Porém, verificou-se aumento significativo na expressão do gene ao longo do crescimento na superfície de folhas de plantas hospedeiras (crescimento epifítico), através de inoculação da bactéria por aspersão (Figura 21B). Os experimentos descritos na Figura 21 foram realizados pelo aluno de Iniciação Científica Lucas de Moraes Ceseti, sob orientação da Profa Cristina Martinez. Estes resultados sugerem que, embora SigF não tenha papel essencial

para a adesão a folhas, este fator sigma pode estar envolvido em aspectos importantes da adaptação ao ambiente epifítico.

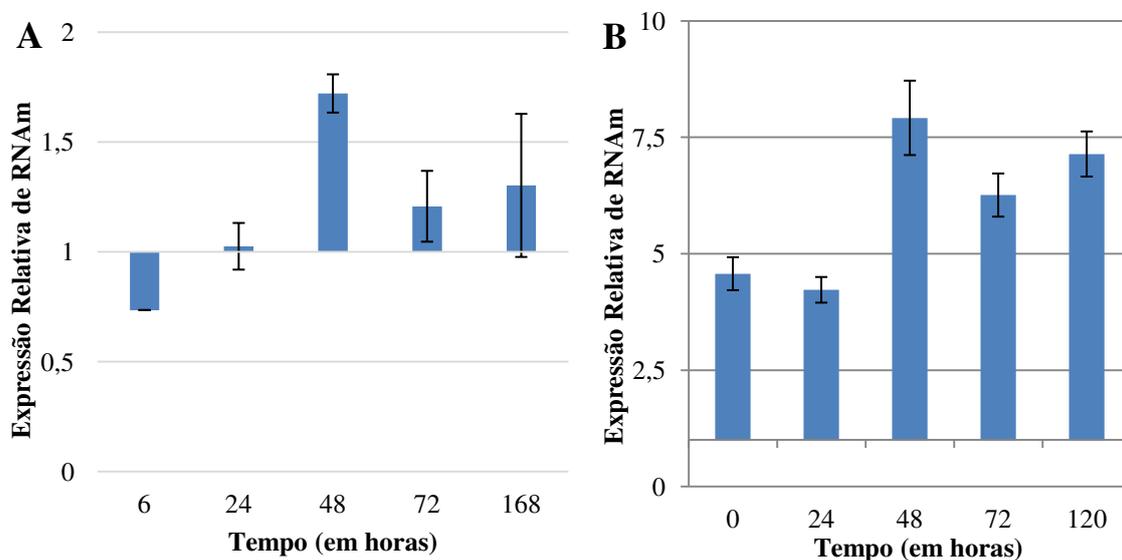


Figura 21. A expressão de *sigF* é induzida no crescimento epifítico e não sofre alterações em resposta ao crescimento no interior de tecido foliar de plantas hospedeiras.

Ensaio de análises de expressão relativa de *sigF* de *Xac* em contato com a planta hospedeira. (A) Expressão relativa de *sigF* em *Xac* no interior de tecido foliar. (B) Expressão relativa de *sigF* em *Xac* de crescimento epifítico. Os gráficos representam a média de no mínimo três experimentos independentes de uma réplica biológica. O ensaio foi realizado no mínimo com duas amostras biológicas. As barras verticais representam o erro padrão.

4.2.4) Ensaio de estresse por UVC e por H₂O₂

Fatores sigma ECF, normalmente, regulam respostas a estresses ambientais. Como visto no item anterior, *sigF* tem aumento de expressão relativa quando a bactéria está na superfície da folha. Nesta condição, ela pode sofrer diversos estresses como deficiência nutricional, competição com outros microrganismos e exposição a radiação UV. Portanto, com o intuito de investigar se o *sigF* atua na resposta a estresse causado por UV foi feito ensaio de sobrevivência a esta radiação. A exposição por 60 segundos de *Xac306* e Δ *sigF* a condição de estresse não mostrou diferença na resistência a radiação por UVC entre as linhagens (Figura 22A).

Ainda foi avaliado o papel do gene na resposta a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 4,4mM (Figura 22B). Os resultados obtidos mostram uma queda de 10% na sobrevivência entre a selvagem e a Δ *sigF*, porém estatisticamente não é significativo.

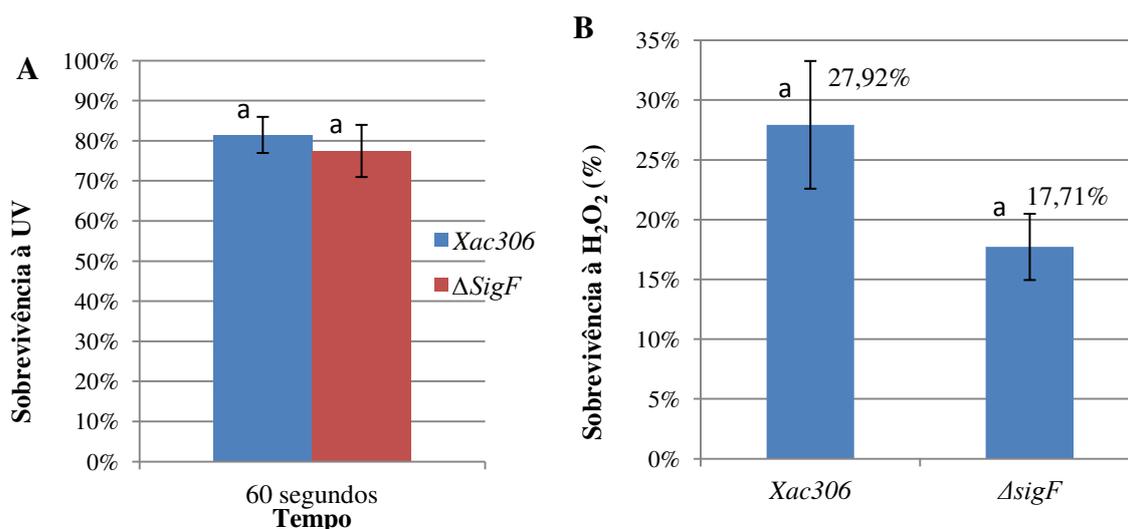


Figura 22. SigF não é essencial para a resposta a estresses por UVC e H₂O₂.

(A) Ensaio de sobrevivência a estresse por UVC. O gráfico representa a média de dois experimentos independentes feitos em triplicata técnica. As barras verticais representam o erro padrão. (B) Ensaio de sobrevivência a estresse oxidativo por 4,4mM de H₂O₂ durante 10 minutos. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. As barras verticais representam o erro padrão. Foi aplicado o teste estatístico t Student ao nível de 5% de probabilidade e as letras acima de cada barra indicam os resultados do teste: letras iguais indicam amostras ou tratamentos sem diferenças significativas pela análise estatística.

4.3) Caracterização Funcional de SigF: Papel na Competição com Microrganismos

O laboratório da Profa. Cristina E. Alvarez-Martinez vem realizando estudos funcionais do SSVI de *Xac* codificado em dois grupamentos gênicos vizinhos a *xac4128* (Figura 10) e ensaios fenotípicos com mutantes de deleção em dois genes essenciais para o funcionamento do SSVI, *hcp* e *clpV*, obtidos no laboratório, estão em andamento. SSVI caracterizados em diversas bactérias Gram-negativas atuam na translocação de proteínas com função de toxinas no ataque a microrganismos competidores, incluindo outras bactérias, leveduras e amebas (Pukatzki et al. 2006; Hood et al. 2010; Haapalainen et al. 2012; Heckel et al. 2014). Porém, resultados de nosso laboratório demonstraram que o SSVI não é importante para a competição com a bactéria Gram-negativa *E.coli* (Alvarez-Martinez C, dados não mostrados), função já atribuída ao SSVI de *Xac* (Souza et al. 2015). Estes ensaios foram também realizados com a linhagem mutante em *sigF* e não se observou diferença no perfil de competição em comparação com a linhagem selvagem (Alvarez-Martinez, dados não mostrados).

Estudos de competição de *Xac* com a ameba *Dictyostelium discoideum* vem sendo desenvolvidos em colaboração com a pesquisadora de pós-doutorado Dra Ethel Bayer dos Santos e seu supervisor Prof Dr Shaker Chuck Farah (Dep. de Bioquímica- IQ/USP). *D. discoideum* é uma ameba de vida livre, encontrada no solo e em associação a folhas caídas,

podendo estar, portanto, frequentemente em competição com *Xac* no ambiente. Esta ameba se alimenta de bactérias, por um mecanismo que em muito se assemelha a fagocitose mediada por macrófagos e, por isso, tem sido usada como modelo para estudo da interação patógeno-hospedeiro em bactérias (Clarke 2010). Resultados dos estudos realizados pela Dra Ethel mostram que *Xac* é bastante resistente a predação pela ameba (Santos, EB e Farah, CS, dados não publicados). Além disto, o SSVI é essencial para a resistência a predação, uma vez que as linhagens mutantes Δhcp e $\Delta clpV$ se mostram muito sensíveis a incubação com a ameba, conforme demonstrado nos ensaios de formação de halo de fagocitose da Figura 23. Os testes foram também realizados com a linhagem mutante em *sigF* e foi possível observar que a linhagem apresenta o mesmo fenótipo de sensibilidade a presença de *D. discoideum* identificado para a linhagem mutante no SSVI Δhcp (Figura 23), sendo complementado pela presença de cópia selvagem de *sigF* no vetor pBRA ($\Delta sigF/pLL001$). Estes resultados são bastante interessantes e indicam um papel direto ou indireto de SigF na regulação de genes importantes para a função do SSVI. O papel de SSVI na sobrevivência a predação por amebas já foi descrito em *V. cholerae* e *Burkholderia cenocepacia* (Pukatzki et al. 2006; Aubert et al. 2008).

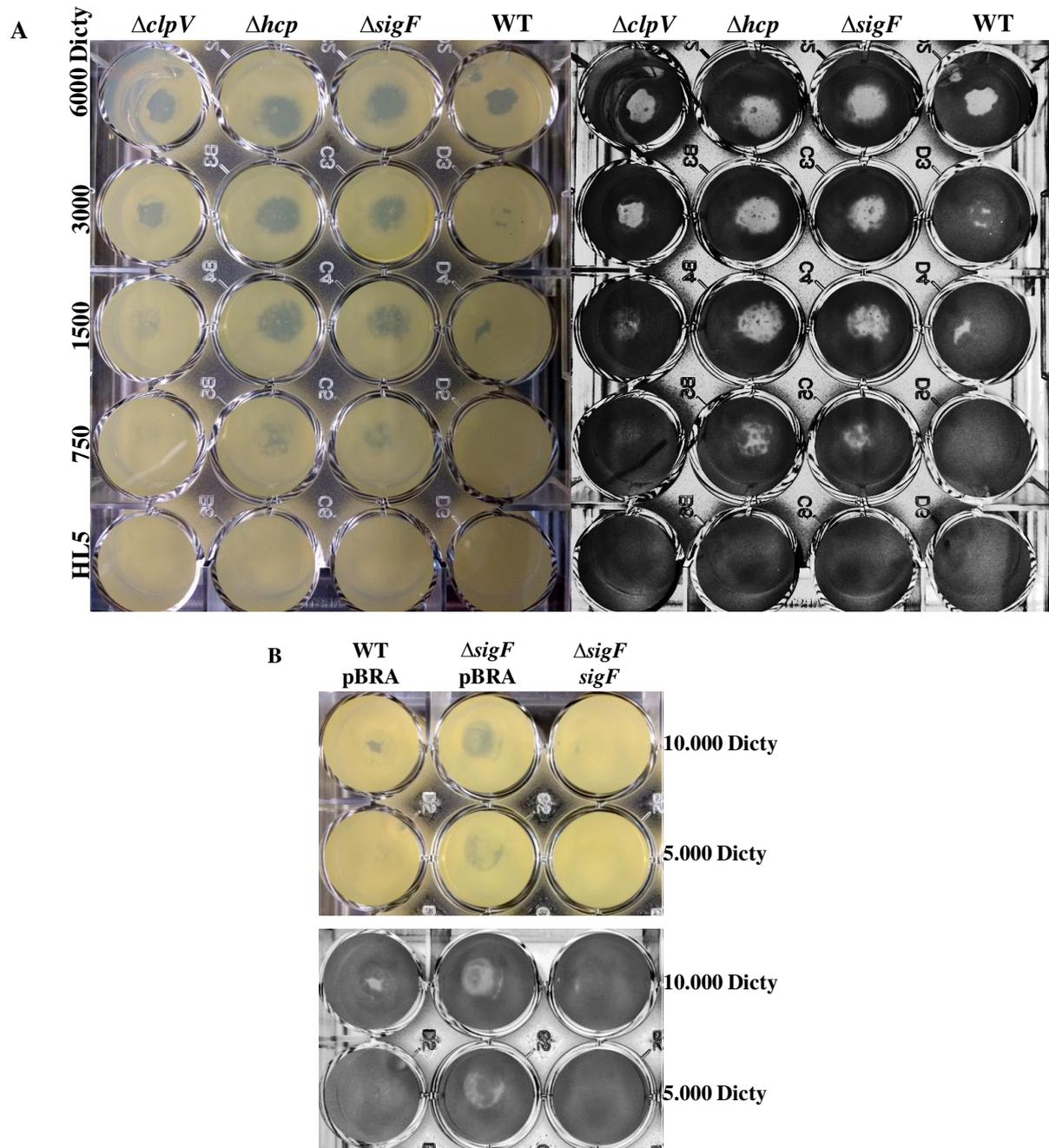


Figura 23. SigF e SSVI são necessários para resistência a predação por *D. discodeium*.

A partir de culturas saturadas, as linhagens de *Xac* selvagem e mutantes foram incubadas por 4 dias com diferentes concentrações de *D. discodeium* discriminadas na fotografia em meio de cultivo HL5 e placas de 24 poços (Froquet et al. 2009). (A) Fotografia mostrando a capacidade de *D. discodeium* de formar halos fagocíticos (espaço transparente ou branco) quando incubadas com mutantes do SSVI (Δclp e Δhcp) e com o $\Delta sigF$. (B) Fotografia mostrando a recuperação do fenótipo de resistência a *D. discodeium* na linhagem $\Delta sigF$ complementada com as construções pLL001 ($sigF^{++}$). Fotografias gentilmente cedidas por Ethel Bayer dos Santos.

4.4) Regulação de Genes que Codificam Componentes do SSVI de *Xac* por σ^F

A identificação dos genes regulados pelo SigF consistiu inicialmente em uma análise de expressão relativa de RNAm de genes candidatos por RT-PCR quantitativo nas

linhagens com níveis alterados de *sigF* ($\Delta sigF$ e $sigF^{++}$) em comparação com a selvagem. Com base nos dados fenotípicos descritos no item 4.3 e na organização genômica de *xac4128*, os genes candidatos foram: *vgrG*, *clpV* e *tssC*, que codificam componentes do sistema de secreção do tipo VI (SSVI), e *sigL*.

Inicialmente, buscamos determinar os níveis de expressão do gene *sigF* pela presença da cópia adicional no vetor pBRA, na ausência de indutor e com 1 e 2 horas após adição da arabinose ao meio de cultura. Com isso, pretendíamos caracterizar melhor a linhagem WT/pLL001 ($sigF^{++}$) e determinar as condições ideais para as análises dos genes candidatos e para ensaios futuros de RNA-Seq. Previamente, culturas saturadas foram lavadas e diluídas para uma $DO_{600nm}=0,1$, sendo então incubadas até a fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm}=0,5$). Em seguida, foi coletada a amostra não tratada com indutor e adicionou-se 0,3% de arabinose ao meio. Amostras foram coletadas 1h e 2h após a adição de arabinose para extração do RNA total. A linhagem selvagem contendo o vetor vazio também foi submetida às mesmas condições como controle. Verificou-se que o nível de expressão do *sigF* sem indutor é 51 vezes maior na linhagem WT/pLL001 em comparação a linhagem WT/pBRA. Após uma hora de indução ocorre um aumento de mais de 1.000 vezes nos níveis de expressão do gene, que se mantém após 2 h (Figura 24).

A mesma análise foi realizada para a linhagem que super-expressa o outro fator sigma, *sigL*. Neste caso, verificou-se que os níveis de *sigL* são 800x aumentados pela presença da cópia extra no pBRA sem indução por arabinose, enquanto ocorre aumento de mais de 10.000 vezes após 1 hora de suplementação com o agente indutor (Figura 24). Este aumento bastante exacerbado pode ser prejudicial a célula e explicaria a dificuldade de crescimento desta linhagem observada nas curvas de crescimento descritas na Figura 15.

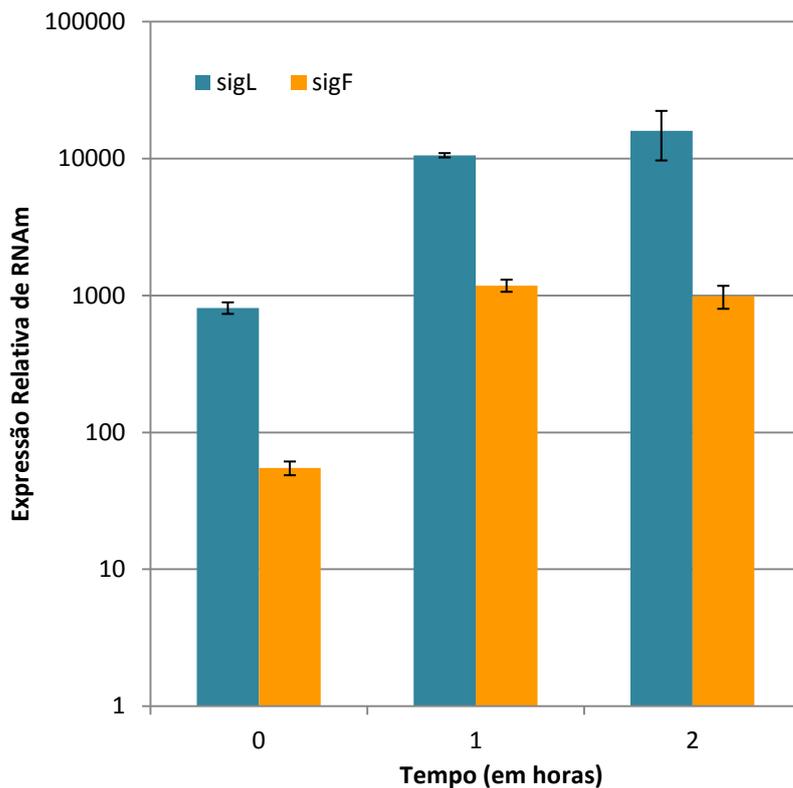


Figura 24. Análise da Expressão Relativa de *sigF* e *sigL* pela presença de cópia extra no vetor pBRA e em resposta ao indutor arabinose.

Ensaio de qRT-PCR foram realizados para determinação dos níveis de RNAm de *sigF* e *sigL* nas linhagens que possuem cópia extra destes genes no vetor pBRA, WT/pLL001 e WT/pLL002, respectivamente. Os resultados representam expressão relativa, tendo como referência a linhagem WT/pBRA. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes de uma réplica biológica. O ensaio foi realizado em duas amostras biológicas, gerando resultados similares. As barras verticais representam o erro padrão.

Em seguida, analisamos a expressão dos genes que codificam componentes do SSVI nas linhagens com níveis alterados de *sigF* ($\Delta sigF$ e WT/*sigF*⁺⁺), comparando-se com linhagem selvagem (

Figura 25). Os resultados obtidos demonstram queda significativa (>2x) na expressão dos genes *vgrG_{xac4124}* e *clpV_{xac4140}* na linhagem mutante em *sigF* (CM001). O gene *tssC* apresentou queda pouco significativa (< 2x) nesta linhagem. Diante da queda na expressão destes genes na linhagem mutante era esperado que houvesse concomitante aumento em seus níveis na linhagem que super-expressa *sigF* (WT/pLL001). No entanto, não se observou alteração significativa nesta linhagem (

Figura 25). Assim, é possível que a presença de cópias extras de *sigF* não leve a expressão do fator sigma funcional, pois o mesmo pode sofrer algum tipo de ativação pós-traducional. Esta hipótese foi considerada devido a uma possível regulação deste sigma por

fosforilação, conforme modelo sugerido para ECFs do grupo 43 por Mascher (2013). Por este modelo, a atividade de SigF estaria sendo regulada direta ou indiretamente por um sistema de fosforilação através de uma proteína serina/treonina quinase chamada eSTK, cujo gene está sempre associado aos sigmas deste grupo e que seria ativada em resposta a percepção de sinal no envelope celular. Porém, apresenta o mesmo contexto que os ECFs do grupo 43: ao seu lado se encontra o gene que codifica uma proteína com domínio de ser/treo quinase PknB, o *pknB_{xac4127}*. Análise realizada com a ferramenta ECF finder (<http://ecf.g21.bio.uni-goettingen.de:8080/ECFfinder/>), desenvolvida por Staron *et al*, 2009, também confirma a classificação de SigF no grupo 43 (Figura 26).

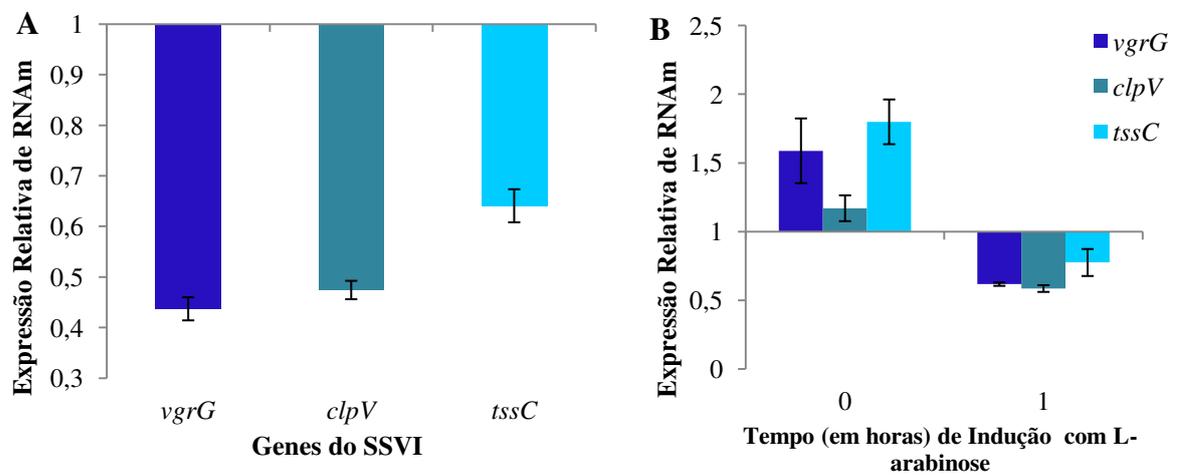


Figura 25. Expressão relativa de genes do SSVI nas linhagens $\Delta sigF$ e $sigF^{++}$.

Ensaio de qRT-PCR para análise dos níveis de RNAm dos genes *vgrG*, *clpV* e *tssC* na linhagem CM001 ($\Delta sigF$) (A) e WT/pLL001 ($sigF^{++}$) (B). Os gráficos representam a média de três experimentos independentes de uma réplica biológica. O ensaio foi realizado em duas amostras biológicas e resultados similares foram obtidos. As barras verticais representam o erro padrão.

sigF Group:ECF43:

Trusted Score for Group : 221.2
Gathering Score for Group : 11.4

ECF43: domain 1 of 1, from 1 to 179: score 223.3, E = 4.1e-66

```

ECF43: domain 1 of 1, from 1 to 179: score 223.3, E = 4.1e-66
      *->mssgdiTqLLqawrsGDpaAldqLlpLVYsELRr1ArrylrrErpgH
      ms+ iT+LLqaw++++p+A d+L++ VY+ LR A+r lrr + +
1001   1  MSELPITELLQAWQRDEPGAGDALARQVYDVL RATAMRELRDA-RA 46

      TLQPTALVnEAYLRLvgKdqaqvewqdRaHFFAiAAqIMRRILVDhArAR
      LQ+T LV+EA++RL q+q+ +++RaHF+++AA MR+ LVD AR +
1001  47 GLQATELVHEAWMRLE---QGQQGFRSRAHFYSVAALQMRHLLVDLARQQ 93

      raqKRGGgavrvledeaaavapperdvLLaLDdALdrLaklDprqArvV
      +++KR + + + + + ++ + r++ L+ + dA+d+La++D+r+A+
1001  94 ASAKR---LGQAVTLTISLSDGAARPEALMLVADAFDKLAQVDERKAKAF 140

      ELRYFgGLTveEiAevLgiSprTVkRdWrfARAWLrreLsdggaec-*
      L +G +v E+Ae+L++S++T +Rd+r+fAR+WL+ +L
1001 141 ALTELVGFSVAEAAEQLEVSVP TLERDLRFARVWLA AQL----- 179

```

Figura 26. Análise da sequência de proteína codificada por *xac4128* pela ferramenta ECF Finder.

“Trusted Score” corresponde a pontuação (valor) limite que uma determinada sequência pode apresentar para ser identificada como membro do grupo ECF em questão. “Gathering Score” é um valor de pontuação limite para classificação dentro do grupo de fatores sigma ECF.

Para testar a hipótese de ativação por fosforilação, foram construídas linhagens que super-expressam versões de *sigF* contendo mutações de substituição de resíduos conservados de treonina ou serina por ácido glutâmico, que mimetizam o estado fosforilado nestes resíduos da proteína (Grindheim et al. 2014). Quatro resíduos foram escolhidos por serem conservados em diferentes ECFs do grupo 43: T7, T51, S149E e T163. Os resíduos foram selecionados através de alinhamento múltiplo de sequências de fatores sigmas que pertencem a este mesmo grupo (Figura 27). As mutações nos resíduos selecionados foram realizadas por mutagênese sítio-dirigida usando a construção pLL001 como molde e as construções resultantes foram denominadas pLL004-pLL007 (Tabela 5), sendo transferidas para a linhagem selvagem de *Xac*. Assim, foram realizados ensaios de qRT-PCR para analisar o efeito destas mutações na expressão dos genes do SSVI, usando-se culturas induzidas ou não com arabinose por 30 min.



Figura 27. Alinhamento Múltiplo de sequencias de fatores sigmas do grupo ECF 43.

O alinhamento foi realizado pela ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Os resíduos conservados estão destacados em retângulos e denominados T7, T51, S149 e T163.

Os resultados das análises de expressão relativa de genes do SSVI nestas quatro linhagens demonstraram que a linhagem que super-expressa a mutação T51E apresentou grande aumento nos níveis de RNAm dos três genes do SSVI analisados (Figura 28). Observa-se aumento maior que 4x para *vgrG_{xac4124}* e *clpV_{xac4140}* após indução de 30 minutos por L-arabinose. Para o gene *tssC_{xac4147}*, que não apresentou queda na linhagem $\Delta sigF$, os

dados mostram um aumento de 4x na sua expressão relativa já antes da indução e de 52x após indução com arabinose (Figura 28). Estes resultados demonstram que SigF regula positivamente a expressão de componentes do SSVI e corroboram com o modelo de regulação pós-traducional de *sigF* por fosforilação.

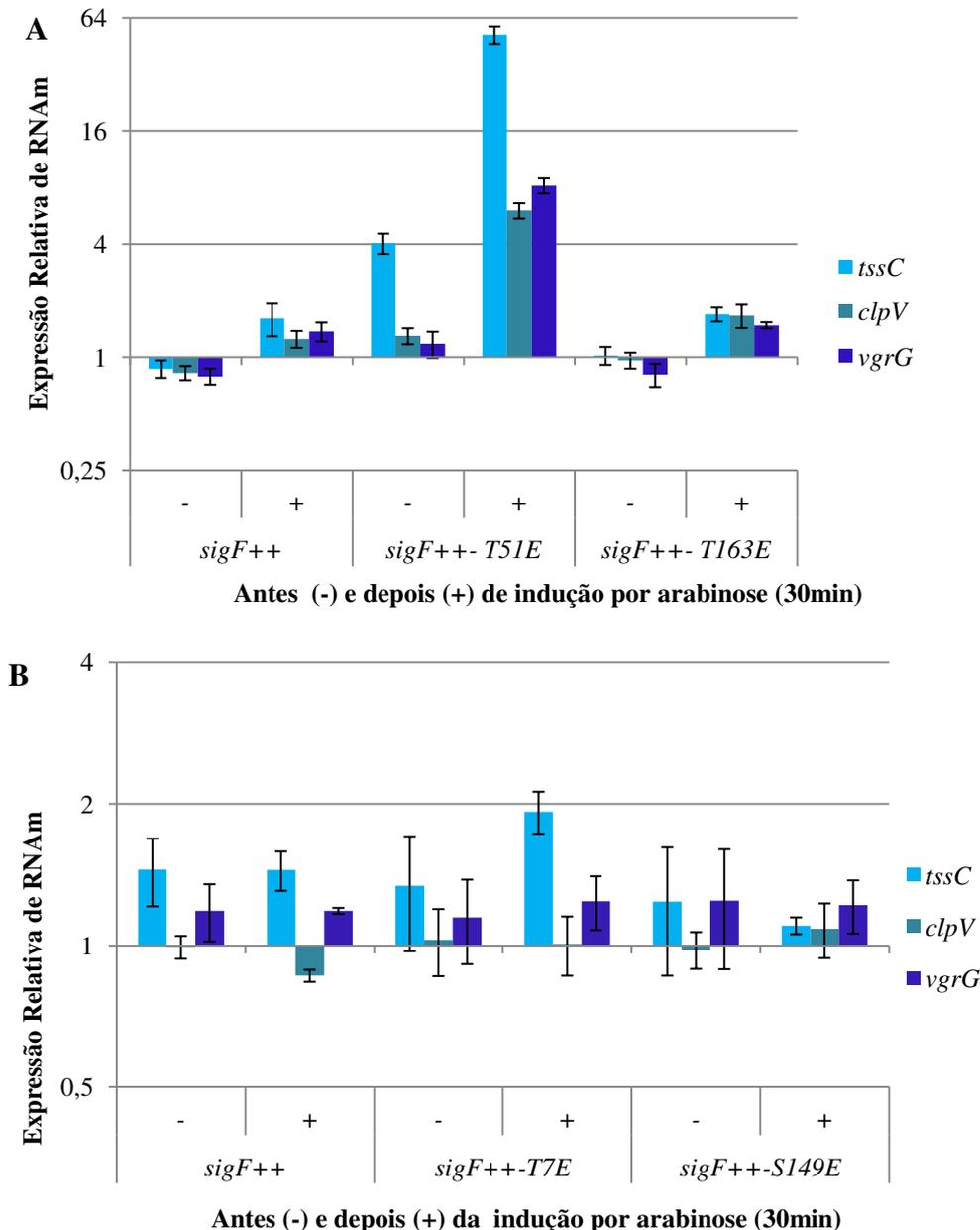


Figura 28. Expressão relativa de genes do SSVI nas linhagens que mimetizam estado fosforilado de σ^F .

Análise da expressão relativa dos genes que codificam componentes do SSVI *vgrG*, *tssC* e *clpV* por ensaios de qRT-PCR. Os ensaios foram realizados com amostras obtidas antes e após indução por 30 min com arabinose na fase exponencial de crescimento em meio 2xTY. O cálculo de expressão relativa foi realizado em referência a linhagem WT/pBRA cultivada nas mesmas condições. O gráfico representa a média de experimentos realizados em duplicata técnica com 2 réplicas biológicas. As barras verticais representam o erro padrão.

Os genes *pknB*_{xac4127}, *PAAR*_{xac4126} também tiveram sua expressão relativa analisada em *sigF*⁺⁺⁺ e *sigF*⁺⁺⁺T51E. Estes genes são transcritos em um provável operon com

sigF, pois ocorre sobreposição de códons de término e início de tradução. Em geral, os fatores sigma ECF reconhecem a região promotora de seu *operon* e, portanto, são auto-regulados positivamente (Helmann 2002). Sendo a quinase o possível regulador de SigF e estando em operon com ele, o aumento do nível de seu RNAm indicaria. Porém, nossos resultados demonstram que não houve aumento auto-regulação positiva significativo na expressão destes genes pela super-expressão das diferentes versões de *sigF*, indicando que não ocorre auto-regulação positiva na expressão de *sigF*. As demais linhagens com super-expressão dos derivados de *sigF* T7E, T163E e S149 também foram testadas e não foram observadas diferenças em comparação a linhagem selvagem (Figura 29).

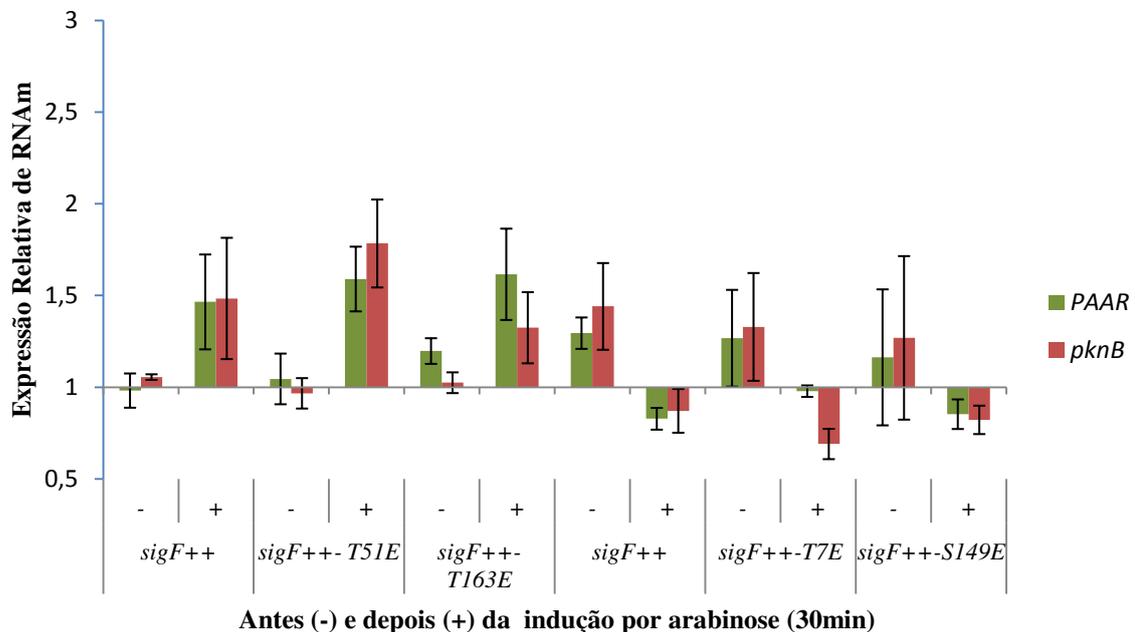


Figura 29. Expressão relativa de *PAAR*_{xac4126} e *pknB*_{xac4127} em *sigF*⁺⁺⁺T51E.

Resultados de qRT-PCR para determinação dos níveis de RNAm de *PAAR*_{xac4126} e *pknB*_{xac4127} nas linhagens que super-expressam *sigF* (*sigF*⁺⁺⁺) e *sigF*⁺⁺⁺T7E a T163E. Os ensaios foram realizados com amostras obtidas antes e após indução por 30 min com arabinose na fase exponencial de crescimento em meio 2xTY. O cálculo de expressão relativa foi realizado em referência a linhagem WT/pBRA cultivada nas mesmas condições. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes, realizados com duas amostras biológicas em duplicata técnica. As barras verticais representam o erro padrão.

Assim, os resultados obtidos acima demonstram que SigF regula positivamente a expressão de genes do SSVI de *Xac*, o que confirma o modelo sugerido com base na análise do fenótipo da linhagem $\Delta sigF$ na sobrevivência a *D. discoideum* (Figura 23). As construções de super-expressão de *sigF* com as mutações T7E-T163E foram também testadas quanto a capacidade de complementar o fenótipo da linhagem $\Delta sigF$ na sobrevivência a predação por *D. discoideum* (os ensaios de placa de fagocitose foram realizados pela Dra Ethel Bayer dos Santos). Com isso, pretendíamos analisar se as versões com mutação mantêm a

funcionalidade de SigF. Os resultados da Figura 30 demonstram que apenas a construção *sigFT51E* complementou o fenótipo de resistência. Estes resultados confirmam que a mutação que promove a indução dos genes do SSVI mantém a funcionalidade de SigF e indica que as outras versões deixaram de ser funcionais devido a alteração realizada.

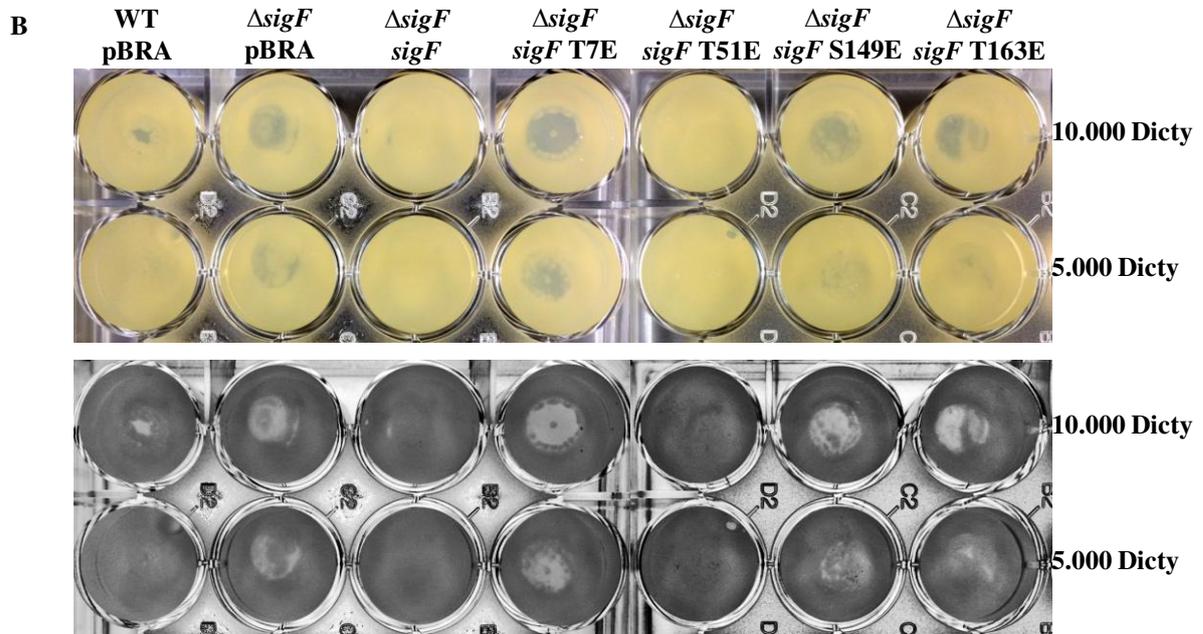


Figura 30. Análise da Complementação do Fenótipo de $\Delta sigF$ pelas versões com mutação T7E a T163E. Ensaio de formação de halo de fagocitose pela ameba *D. discoideum* em placa de 24 poços. Culturas das linhagens de *Xac* indicadas na parte superior da figura foram inoculadas em poços e amostras contendo a quantidade de células da ameba indicadas a direita da figura foram inoculadas no centro dos poços. Fotografia cedida por Ethel Bayer dos Santos.

A presença de genes vizinhos codificando fatores sigma ECF, transcritos em direções opostas é intrigante e pode indicar possível regulação recíproca ou cascata de regulação entre eles. Assim, para testar possível regulação de um deles sobre o outro, analisamos a expressão de *sigF* na linhagem que super-expressa *sigL* e vice-versa.

Os resultados obtidos demonstram que a expressão de *sigF* não tem variação significativa (>2 vezes) na linhagem *sigL++* (WT/pLL002) antes da adição do indutor e apresenta queda de cerca de 5 vezes 1 hora após a adição do indutor (Figura 31). Esta queda pode indicar um efeito negativo global na expressão gênica celular, devido ao aumento exacerbado nos níveis deste gene. Estes dados indicam que o fator sigma SigL não está envolvido na indução da expressão do fator sigma vizinho *sigF*.

A expressão do gene *sigL_{xac4129}* foi avaliada na linhagem mutante para o *sigF* ($\Delta sigF$ ou CM001) e observou-se queda de duas vezes nesta linhagem em comparação a selvagem. No entanto, não foi observado aumento nas linhagens de super-expressão tanto de

sigF selvagem como na linhagem *sigF++/T51E*. Este resultado sugere que SigF não está envolvido na regulação de SigL (Figura 32).

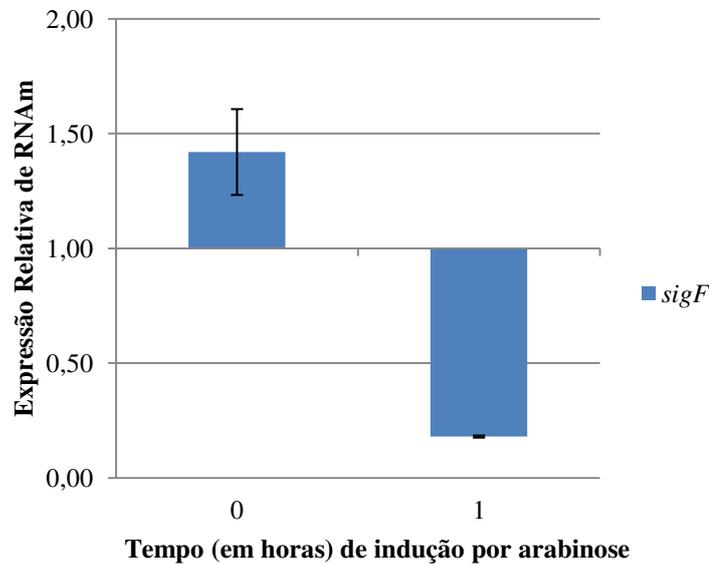


Figura 31. Expressão relativa de *sigF* na linhagem *sigL++*.

Resultados de RT-PCR quantitativo para determinação dos níveis de RNAm de *sigF* na linhagem que super-expressa *sigL* (WT/pLL002). Os ensaios foram realizados com amostras obtidas antes e após indução de 1 hora com arabinose na fase exponencial de crescimento em meio 2xTY. O cálculo de expressão relativa foi realizado em referência a linhagem selvagem no tempo 0h. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes de uma réplica biológica. O ensaio foi realizado em duas amostras biológicas. As barras verticais representam o erro padrão.

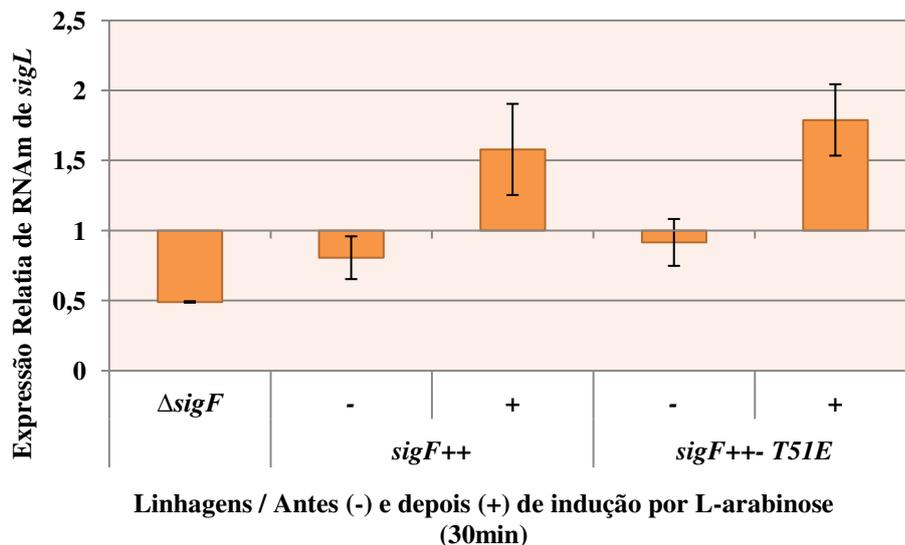


Figura 32. Expressão relativa de *sigL* nas linhagens $\Delta sigF$, *sigF++* e *sigF++- T51E*.

Resultados de RT-PCR quantitativo para determinação dos níveis de RNAm de *sigL* na linhagem CM001 ($\Delta sigF$) e nas linhagens que super-expressam *sigF* (*sigF++* ou WT/pL001 e *sigF++T51E* ou WT/pL005). Os ensaios foram realizados com amostras obtidas antes e após indução por 30 min com arabinose na fase exponencial de crescimento em meio 2xTY. O cálculo de expressão relativa foi realizado em referência a linhagem selvagem cultivada nas mesmas condições. O gráfico representa a média de no mínimo três experimentos independentes. O ensaio foi realizado em duas amostras biológicas. As barras verticais representam o erro padrão.

4.5) Identificação dos Regulons de SigF e SigL

Com base nos dados obtidos e descritos no item 4.4, o perfil de transcriptoma das linhagens selvagem e de super-expressão da cópia selvagem de *sigF* e da cópia com mutação T51E (WT/pBRA, WT/pLL001 e WT/pLL005) foram avaliados por sequenciamento de RNAm (RNA-Seq), com o objetivo de identificar o conjunto total de genes regulados por SigF. Para isso as amostras de RNA total foram extraídas de culturas induzidas durante 30 minutos com L-arabinose após serem cultivadas em meio 2xTY até a fase exponencial de crescimento de $DO_{600nm} = 0,5$.

Além disto, realizamos também ensaios de RNA-Seq com a linhagem de super-expressão de *sigL* (WT/pLL002), com o objetivo de verificar possível sobreposição de regulons e regulação de genes relacionados. Nestes ensaios, a comparação com a linhagem parental WT/pBRA foi realizada em culturas de fase exponencial mantidas sem adição de arabinose, pois observou-se um aumento muito exacerbado na expressão de *sigL* pela adição do indutor (Figura 24) e dados preliminares de RT-PCR quantitativo indicaram a queda na expressão de diversos genes testados em condições de indução de *sigL*, indicando um efeito negativo global para a bactéria mantida nestas condições (dados não mostrados).

Os dados gerados nos experimentos foram analisados conforme fluxograma apresentado na Figura 33, com a colaboração do doutorando Alan Lorenzetti, sob orientação da Profa Dra Tie Koide (Dep de Bioquímica – FMRP/USP).

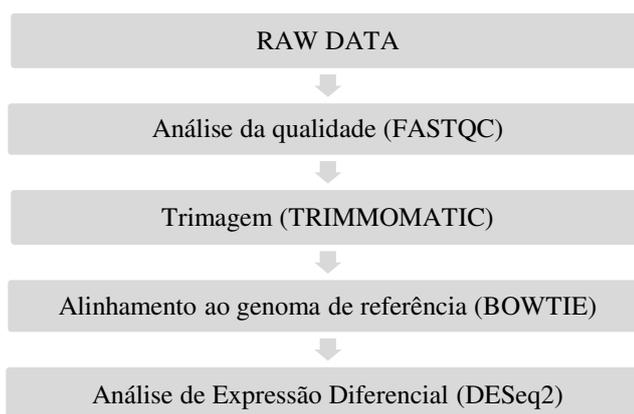


Figura 33. Fluxograma de análise dos dados de RNA-Seq.

A avaliação geral dos dados gerados mostrou que as *reads* obtidas ficaram com ótima qualidade e, portanto, não foi necessária a etapa de “trimagem” para retirada das sequências com baixa qualidade. Depois, as *reads* foram alinhadas ao genoma de referência utilizando o software Bowtie v1.1.2 e seguida pela análise da expressão diferencial com o pacote DESeq2. Nesta etapa foi feita análise exploratória dos dados pelo método de

clusterização, assim agrupando as amostras que são similares confirmando as réplicas biológicas. O *Heatmap* mostra dissimilaridade entre as amostras através da distância euclidiana n-gene-dimensional de contagens normalizadas. Portanto, quanto menor for a dissimilaridade mais iguais são as amostras. Na Figura 34, o vermelho escuro na diagonal é igual a zero, pois, é a distância da amostra em relação a ela mesma. Há uma diferença clara entre as amostras não induzidas e as induzidas, pela adição de arabinose por 30 min (WT/pBRA não-induzida e *sigL++* versus WT/pBRA induzida, *sigF++* e *sigF++*- T51E). Os resultados demonstram que as réplicas biológicas de cada linhagem estão bem similares entre si. Nota-se também a diferença bem evidente entre as linhagens WT/pBRA e a *sigF++*-T51E (WT/pLL005), o que indica que a substituição de aminoácido tenha tornado o SigF ativo, como mostrado com os resultados de análise de expressão relativa na seção anterior.

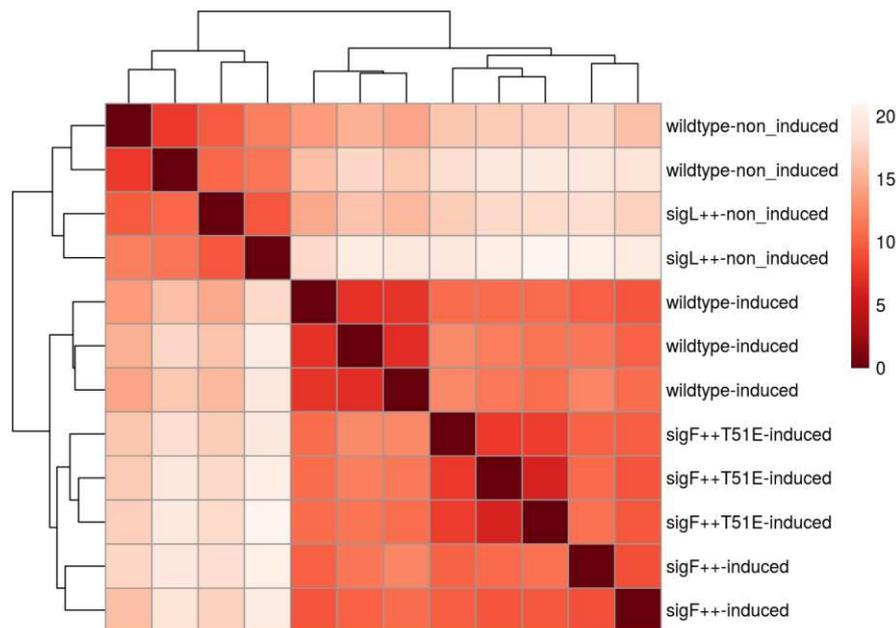


Figura 34. Análise por *Heatmap* dos Resultados de RNA-Seq para comparação de todas as réplicas biológicas das linhagens analisadas.

WT (WT/pBRA) com e sem indução por 30 min com arabinose, *sigL++* sem indução, *sigF++*T51E (WT/pLL005) com indução e *sigF++* (WT/pLL001) com indução. A intensidade de vermelho indica dissimilaridade entre as amostras, quanto mais intenso o vermelho menor a dissimilaridade, conforme indicado pelos valores numéricos na escala ao lado do *Heatmap*. Os quadros do centro na diagonal são as amostras comparadas com elas mesmas. Os quadros subsequentes são comparações com as demais amostras, conforme indicado pelo dendograma.

Ainda outra análise foi feita para mostrar os 40 genes com maior variação entre as amostras (Figura 35). Este resultado está na forma de *Heatmap*, onde cada bloco do mapa corresponde ao desvio em relação à média, assim, mostrando a variação dos genes nas amostras. Os primeiros genes mostrados no mapa possuem desvio positivo: o *sigF_{xac4128}* nas linhagens *sigF⁺⁺* e *sigF⁺⁺T51E* e *sigL_{xac4129}* na *sigL⁺⁺*, uma vez que são os genes com expressão aumentada através da cópia extra no vetor pBRA. Em relação aos genes do SSVI

que haviam sido analisados por RT-PCR quantitativo, eles apresentam desvio positivo *sigF++T51E*, confirmando os dados da análise por RT-PCR quantitativo. No caso da linhagem *sigL++*, os genes com maiores desvios são *xac4131* e *xac4132*. As réplicas biológicas de *sigL++* e selvagem sem indução apresentaram pouca distinção e as duas amostras biológicas de *sigL++* mostraram uma maior variação entre elas. Estes resultados prévios mostram que os fatores sigmas SigF e SigL possuem *regulons* diferentes.

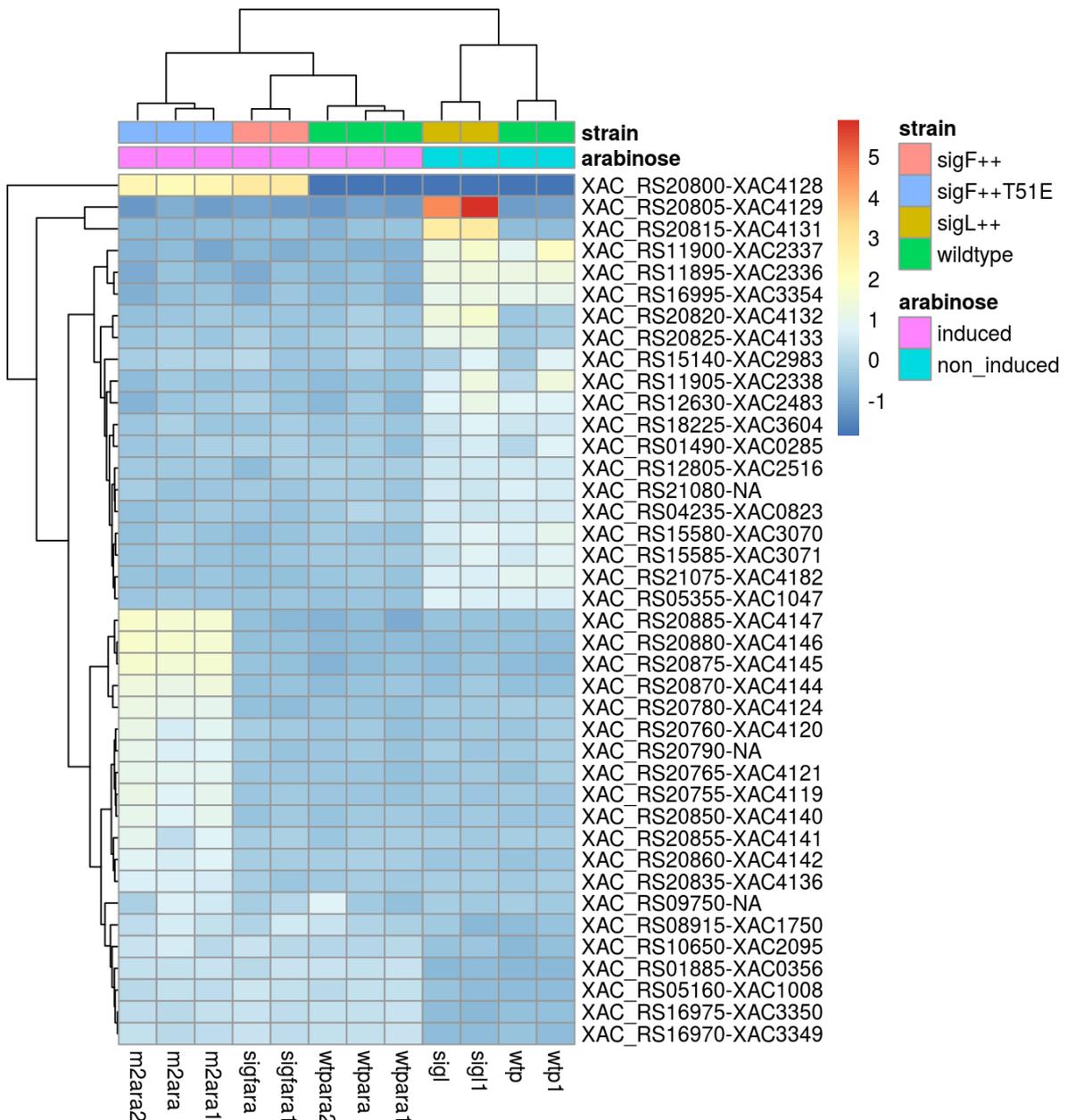


Figura 35. Heatmap dos 40 genes com maior variação entre todas as amostras analisadas.

Legenda: *sigfara* e *sigfara1*: *sigF++*, réplicas biológicas 1 e 2; *m2ara*, *m2ara1* e *m2ara2*: *sigF++T51E*, réplicas biológicas 1, 2 e 3; *wtpara*, *wtpara1* e *wtpara2*: *Xac306/pBRA* vazio com indução por arabinose de 30 min, réplicas biológicas 1, 2 e 3; *wtp* e *wtp1*: *Xac306/pBRA* vazio, réplicas biológicas 1 e 2 sem indução por arabinose; *sigl* e *sigl1*: *sigL++*, réplicas biológicas 1 e 2 sem indução por arabinose. A escala ao lado do *heatmap* mostra o significado das cores em valores numéricos. Estes valores significam o desvio em relação a média calculada para cada gene em uma matriz.

Na análise dos dados de RNA-Seq, genes com *p-value* ajustado (*padj*) <0,1 e *Log2 Fold Change* ≥ 1 foram considerados diferencialmente expressos, o que retornou apenas genes com a expressão aumentada, assim, apontando que não há efeito de repressão indireta em genes pela super-expressão destes fatores sigma. A queda na expressão de genes pela super-produção de um fator sigma poderia ocorrer por efeito de competição entre fatores sigma pelo cerne da RNA polimerase (Malik et al. 1987). Nas abaixo estão as listas dos genes que sofrem alteração significativa em sua expressão nas linhagens *sigL⁺⁺* e em *sigF⁺⁺T51E*, nessa ordem. Logo, evidenciando os distintos *regulons* de cada fator sigma.

Como pode ser visto na Tabela 8, 3 genes regulados por SigL foram identificados em nossa análise, todos localizados em um possível *operon* na região entre *clusters* do SSVI e codificando proteínas hipotéticas conservadas (Figura 36). O gene *xac4131* codifica uma proteína com motivos para receptor dependente de TonB, um domínio N-terminal característico de FecA, que atua na inativação do anti-sigma dos sigmas da família FecI. O gene *xac4132* codifica uma proteína com domínios de fosfatase ácida. O último gene com expressão aumentada em *sigL⁺⁺*, o *xac4133*, codifica uma proteína com domínio de lectina característico de plantas (domínio jacalina) e que atua na ligação a carboidratos. Além disto, este gene codifica um domínio de esfingomielinase, fosfodiesterase que catalisa a degradação de esfingomielina em membranas biológicas.

Um fato interessante nestes dados de transcriptoma é não haver aumento de expressão do gene *xac4130*, que está em provável *operon* com o *sigL* e codifica o seu possível fator anti-sigma, pois possui domínios característicos de FecR, o regulador anti-sigma de σ^{FecI} de *E.coli* (Braun et al. 2006). Normalmente, fatores sigma ECF sofrem auto-regulação positiva, reconhecendo a região promotora do próprio *operon* que o codifica e transcrevendo juntamente o fator anti-sigma cognato.

Tabela 8. Genes com expressão aumentada na linhagem *sigL⁺⁺*.

<i>Locus</i> dos Genes	Anotação	Varição Relativa (Log_2) Fold Change
<i>xac4129</i>	<i>sigL</i>	5,6157
<i>xac4131</i>	Receptor dependente de TonB, FecA	4,9733
<i>xac4132</i>	Fosfatase ácida	2,6612
<i>xac4133</i>	Esfingomielinase	2,0501

*Os *locus* dos genes estão identificados com as anotações antigas.

Como visto nas análises prévias das Figura 34 e Figura 35, *sigF⁺⁺T51E* apresenta maior diferença em seu perfil global de expressão gênica em relação a linhagem selvagem do

que a linhagem *sigF⁺⁺*. Com o uso dos parâmetros de análise já mencionados, não foram identificados genes diferencialmente expressos em *sigF⁺⁺*, a exceção dele mesmo. Por outro lado, 25 genes foram significativamente induzidos na linhagem que super-expressa *sigF* T51E, sugerindo, mais uma vez, que a fosforilação é o fator determinante para converter este fator sigma em sua forma ativa. A maioria dos genes diferencialmente expressos em *sigF⁺⁺T51E*, cerca de 80%, codificam componentes estruturais e de regulação do SSVI (Figura 36 e Tabela 9). O *regulon* se fragmenta nos dois *clusters* do sistema de secreção. Os demais integrantes do *regulon* são:

- a) O *xac4136*, é o único gene da região entre *clusters* regulado pelo SigF. Este gene codifica um domínio de fascina, proteína envolvida na organização de estruturas baseadas em actina.
- b) O *feaR*, que codifica um regulador transcricional da família AraC. O FeaR já foi descrito em *E. coli* como regulador positivo de *tynA* (amino-oxidase periplasmica) e *feaB* (fenilacetaldeído desidrogenase) (Zeng & Spiro 2013). Está localizado no genoma de *Xac* próximo ao SSVI (Figura 36);
- c) Há também a expressão aumentada de dois genes que codificam MsrA (*xac0900* e *xac3691*), oxidoredutases que reparam resíduos de metionina oxidados e estão associadas a sobrevivência a estresse oxidativo;
- d) Dois genes que codificam chaperonas (*xac1300* e *xac3195*), enzimas que atuam no enovelamento correto das proteínas.

Tabela 9. Genes em *sigF*⁺⁺T51E com expressão aumentada.

Locus dos Genes*	Anotação	Varição Relativa (Log₂)
<i>xac4128</i>	<i>sigF</i>	9,6847
<i>xac4147</i>	<i>tssC</i>	4,0602
<i>xac4145</i>	<i>hcp</i>	3,9596
<i>xac4146</i>	<i>tssB</i>	3,8520
<i>xac4144</i>	<i>tagJ</i>	3,2205
<i>xac4124</i>	<i>vgrG</i>	2,6468
<i>xac4120</i>	<i>tssL</i>	2,4863
<i>xac4126</i>	<i>PAAR</i>	2,2884
<i>xac4121</i>	<i>tssK</i>	2,2813
<i>xac4119</i>	<i>tssM</i>	2,2768
<i>xac4140</i>	<i>clpV</i>	2,1455
<i>xac4143</i>	<i>tssE</i>	1,8592
<i>xac4118</i>	<i>tagF</i>	1,7690
<i>xac4141</i>	<i>tssG</i>	1,7368
<i>xac4122</i>	<i>fha</i>	1,6284
<i>xac4148</i>	<i>feaR</i> Regulador transcricional família AraC	1,5883
<i>xac4142</i>	<i>tssF</i>	1,5832
<i>xac4117</i>	<i>pppA</i>	1,5652
<i>xac4136</i>	Proteína hipotética conservada fascina	1,4774
<i>xac4125</i>	Proteína hipotética conservada	1,4628
<i>xac4123</i>	Proteína hipotética conservada	1,2110
<i>xac0900</i>	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	1,1497
<i>xac3691</i>	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase	1,0341
<i>xac1300</i>	Hsp15 (chaperona)	1,0238
<i>xac3195</i>	ClpB (chaperona)	1,0212

*Os locus dos genes estão identificados com as anotações antigas.

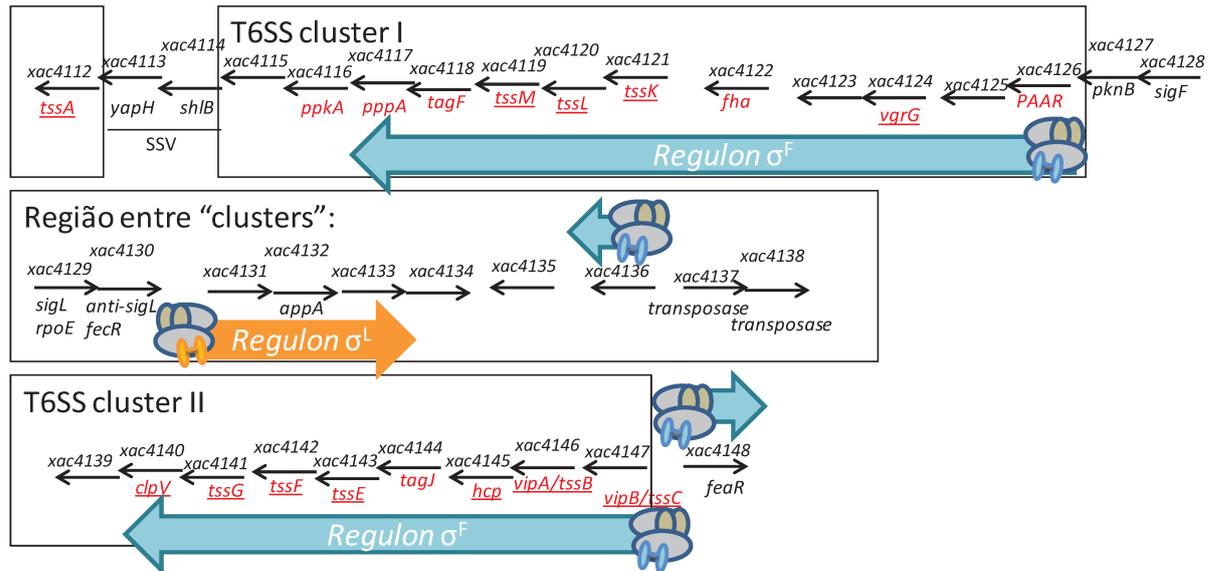


Figura 36. Organização estrutural da região do genoma de *Xacondo* estão os genes *sigF* e *sigL* e seus respectivos regulons.

4.6) Fosforilação *in vitro* do σ^F pela Proteína Quinase PknB.

Os dados genéticos obtidos sugerem fortemente que a forma ativa do fator sigma ECF 43 SigF é em estado fosforilado. É possível que a quinase PknB codificada por *xac4127* realize esta modificação pós-traducional. Isto é proposto porque todos os fatores sigma ECF do grupo 43 identificados por análise de genomas apresentam este mesmo contexto genômico (Staroń et al. 2009).

Portanto, para avaliar se SigF é fosforilado diretamente por PknB, versões destas proteínas contendo cauda de 6xhis na extremidade amino-terminal foram purificadas a partir de expressão heteróloga em cepas de *E.coli* (Figura 38) e ensaios de fosforilação *in vitro* foram realizados. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Centro de Estudo de Quinases SGC (*Structural Genome Consortium*), localizado na UNICAMP, sob a supervisão do Dr Rafael Couñago. Especificamente para a PknB foram obtidas oito construções com versões do domínio quinase para expressão em *E.coli*. Entre elas, as construções pLL013 e pLL015 (Tabela 5) foram usadas para purificação em larga escala (Figura 37). A PknB apresenta similaridade no domínio quinase com a PknB de *M. tuberculosis*, cuja estrutura já foi resolvida (Mieczkowski et al. 2008; Young et al. 2003).

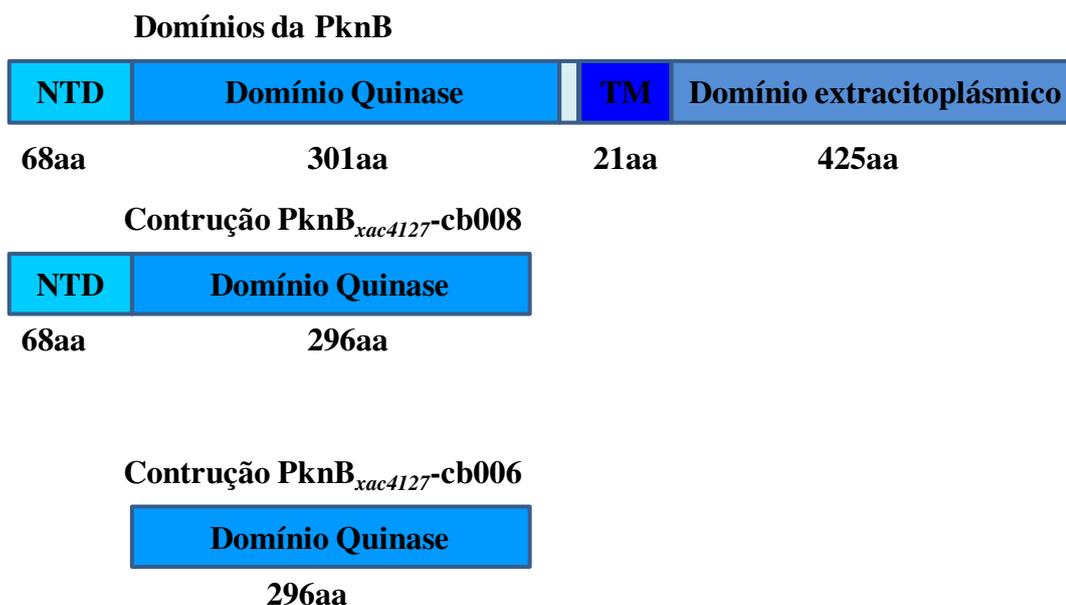


Figura 37. Esquema dos domínios da PknB e das construções utilizadas.

Esquema representativo dos domínios apresentados pela PknB e os mantidos nas construções utilizadas. Os retângulos não estão em escala com o tamanho dos domínios. Acima dos esquemas está a sequência da PknB com setas indicativas dos domínios. NTD, domínio amino-terminal não incluído na anotação do gene *xac4127* no KEGG (<http://www.kegg.jp/>). TM, domínio transmembrana.

As duas versões do domínio quinase e o SigF foram purificados por coluna de afinidade, com uso de resina de níquel, seguindo-se de coluna de gel filtração. A PknB_{xac4127}-cb008 teve o maior rendimento e, por isso, teve sua cauda de histidina retirada por incubação com a protease TEV, cujo sítio de reconhecimento está localizado após a sequência que codifica a cauda de histidina. As demais tiveram pouco rendimento, assim, para não haver maiores perdas com etapas de purificação, a cauda de histidina foi mantida em PknB_{xac4127}-cb006 e SigF.

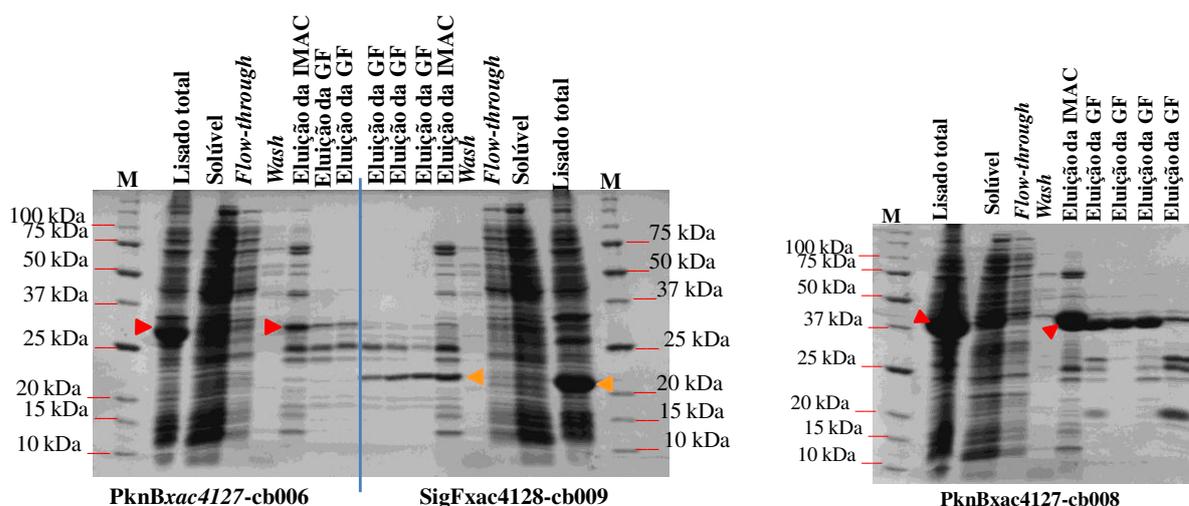


Figura 38. Análise por SDS-PAGE das frações obtidas nas diferentes etapas de purificação de SigF e PknB.

M: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained (Bio Rad); IMAC: cromatografia por afinidade a metais imobilizados; GF: cromatografia por gel filtração. As setas em vermelho indicam os domínios de quinase purificado (PknB_{xac4127-cb006} com 33,1 kDa e PknB_{xac4127-cb008} com 42 kDa); as setas em laranja indicam SigF, com 22,4 kDa.

O ensaio de fosforilação foi realizado após a obtenção dos domínios quinase e do substrato (SigF) purificados, conforme descrito em Material e Métodos. Para detectar fosforilação no SigF, as duas versões de quinase foram usadas em duas concentrações diferentes. A PknB_{xac4127-cb006} foi usada nas concentrações de 7,65 μ M e 153nM. A PknB_{xac4127-cb008}, nas concentrações de 5,23 μ M e 105nM. A concentração do SigF foi de 45 μ M. Os resultados apresentados abaixo foram obtidos usando as concentrações de 7,65 e 5,23 μ M de PknB (Tabela 10). A fosforilação pode ser detectada pelo aumento da massa da proteína em espectrometria de massas, uma vez que a adição do fósforo acrescenta 80Da a massa total.

Os resultados descritos na Tabela 10 demonstram que a versão do domínio quinase capaz de fosforilar uma pequena fração de SigF foi a PknB_{xac4127-cb008} que, diferente da PknB_{xac4127-cb006}, possui uma fração N-terminal que não constava na anotação original do gene (Figura 37). Os resultados demonstram também que somente esta versão da proteína é capaz de se auto-fosforilar. A PknB_{xac4127-cb008} apresentou também um segundo evento de fosforilação, dado que apareceu uma segunda espécie com acréscimo de 160Da quando incubada sem substrato e na presença de ATP. A fosforilação do SigF foi de apenas 5%, estando ausente em outras condições. Estes resultados são promissores, porém, será necessário realizar a otimização das condições de reação (aumento do tempo de incubação, aumento da concentração de ATP, entre outros fatores) para obter maior fração fosforilada.

Tabela 10. Resultado do Ensaio de Fosforilação.

Quinase	Substrato	ATP	Presença /Fração de fosforilação na proteína analisada		
			Proteína Analisada	Tempo de incubação	
				0 min	60 min
(Ausente)	SigF _{xac4128} -cb009	Sim	SigF	Nenhuma	Nenhuma
PknB _{xac4127} -cb006	SigF _{xac4128} -cb009	Sim	SigF	Nenhuma	Nenhuma
PknB _{xac4127} -cb008	SigF _{xac4128} -cb009	Sim	SigF	Nenhuma	5%
PknB _{xac4127} -cb006	SigF _{xac4128} -cb009	Sim	PknB _{xac4127} -cb006	Nenhuma	Nenhuma
PknB _{xac4127} -cb008	SigF _{xac4128} -cb009	Sim	PknB _{xac4127} -cb008	27%	30%
PknB _{xac4127} -cb006	(Ausente)	Sim	PknB _{xac4127} -cb006	Nenhuma	Nenhuma
PknB _{xac4127} -cb006	(Ausente)	Não	PknB _{xac4127} -cb006	Nenhuma	Nenhuma
PknB _{xac4127} -cb008	(Ausente)	Sim	PknB _{xac4127} -cb008	35%	100% com 80Da e 5% com 160Da
PknB _{xac4127} -cb008	(Ausente)	Não	PknB _{xac4127} -cb008	30%	30%

Construções da quinase, ATP e substrato ou, apenas, construções da quinase com ou sem ATP foram incubados por 1 hora a 37°C. Aliquotas antes e depois da incubação foram retiradas e armazenadas com ácido fórmico 0,1% no -80°C até serem analisadas por espectrometria de massa.

5) DISCUSSÃO

5.1) SigF e a Interação de *Xac* com o Hospedeiro e o Ambiente

Por *Xac* ser um patógeno de plantas de citros, um dos primeiros ensaios fenotípicos realizados para a caracterização das linhagens mutante e de super-expressão de *sigF* foi o de virulência por infiltração em folhas de laranja. Ambas as linhagens, $\Delta sigF$ e *sigF*⁺⁺, foram capazes de desenvolver o cancro cítrico em perfil similar a linhagem selvagem. Dados de análise de expressão relativa também revelaram que *sigF* não é expresso em altos níveis ou induzido quando *Xac* está causando o processo infeccioso, o que corrobora os dados de ensaios de virulência. É importante destacar que a inoculação por injeção não permite identificar possíveis diferenças nas etapas iniciais da infecção, incluindo aderência, sobrevivência epifítica e capacidade de penetração no tecido. Para testar alguns destes aspectos, dois ensaios foram realizados: um de aderência a superfície foliar e outra de formação de biofilme em superfície abiótica. Nossos resultados demonstram que SigF não desempenha papel essencial na capacidade de aderência a superfície tanto biótica como abiótica.

A expressão relativa de *sigF* também foi analisada em *Xac* ao longo do crescimento na superfície foliar, após inoculação por aspersão. Nesta análise *sigF* teve aumento na sua expressão relativa ao longo dos tempos analisados, o que indica um papel importante para este regulador nestas condições de crescimento. Curiosamente, os genes do SSVI também foram analisados e apresentaram o mesmo perfil de expressão relativa nestas condições, corroborando com os demais dados obtidos neste trabalho que demonstram a regulação destes genes por SigF (CESETI LM et al. dados não publicados). A superfície foliar é ambiente suscetível a diversas variações ambientais. Assim, para sobreviver neste ambiente, a bactéria precisa se dispor de estratégias contra a limitação de nutrientes, flutuações na temperatura, radiação UV, períodos de estresse hídrico e competição com outros microrganismos (Gnanamanickam & Immanuel 2006; Müller et al. 2016). A linhagem $\Delta sigF$ foi submetida a diversos estresses ambientais: carência de ferro, radiação por UVC e estresse oxidativo por peróxido hidrogênio e os resultados demonstraram que SigF não é essencial em nenhuma das condições testadas. Para complementar estes estudos, será importante analisar o papel de SigF na sobrevivência epífita de *Xac* através de curvas de crescimento e na virulência após inóculo por aspersão.

A análise do contexto genômico de *sigF* sugere uma função relacionada ao SSVI de *Xac* (Figura 10). Diversos SSVI estão envolvidos na competição com microrganismos, por mediarem a translocação de proteínas tóxicas para bactérias, leveduras ou amebas (Pukatzki et al. 2006; Hood et al. 2010; Haapalainen et al. 2012; Heckel et al. 2014). Paralelamente a este trabalho, o nosso grupo vem realizando estudos funcionais do SSVI de *Xac* e foi demonstrado que este sistema tem papel essencial na resistência a predação pela ameba *D.discoideum*, sendo dispensável para a competição com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SANTOS EB, FARAH CS E ALVAREZ-MARTINEZ, CE, dados não publicados). A linhagem $\Delta sigF$ apresentou o mesmo fenótipo de sensibilidade a competição com ameba demonstrado pela linhagem mutante no SSVI e os resultados de RNA-seq confirmam o papel de *sigF* na regulação de todos os genes que codificam os componentes essenciais deste sistema de secreção.

Xac é uma bactéria que possui pelo menos um representante de cada tipo de sistema de secreção (da Silva et al. 2002; Sluys et al. 2002; Boyer et al. 2009). O SSII é responsável pela secreção de enzimas de degradação de parede celular da planta, tais como endoglucanases e celulasas, e o SSIII está envolvido com a secreção de proteínas efetoras no citosol de células do hospedeiro, sendo ambos essenciais para a patogenicidade de *Xac* (Moreira et al. 2004). No aspecto de adaptação e sobrevivência ao ambiente, *Xac* é capaz de secretar toxinas que atuam na degradação de peptidoglicano de bactérias Gram-negativas através de um SSIV (Souza et al. 2015). Da mesma forma, o SSVI também tem papel fundamental neste aspecto importante para a disseminação e persistência de *Xac* no ambiente por atuar na sobrevivência a amebas, encontradas em associação a folhas e no solo. O papel de SSVI na sobrevivência a amebas já foi descrito em *V.cholerae*, *B. cenocepacia*, no fitopatógeno *P. syringae* (Pukatzki et al. 2006; Saier et al. 2006; Haapalainen et al. 2012; Aubert et al. 2008), bactérias de vida livre que frequentemente podem estar sujeitas a predação por amebas e são capazes de se replicar no interior destes microrganismos (Van der Henst et al. 2016).

5.2) Sinalização de SigF e SigL e a Regulação do SSVI

Os dados obtidos por análises de RNA-seq mostraram que o fator sigma ECF SigF regula a expressão de genes que codificam o sistema de secreção do tipo VI (SSVI) em *Xac*. Tem sido demonstrado que o SSVI é um fator que contribui para adaptação, adesão e virulência em bactérias. Assim sua expressão torna-se necessária apenas em condições

específicas, como em competição com outros microrganismos ou em um processo infeccioso, o que requer um mecanismo de regulação preciso. Há na literatura alguns relatos anteriores de regulação da expressão de genes de sistemas de secreção por fatores sigma alternativos em outras bactérias.

Existem descrições da regulação de SSVI pelo fator sigma alternativo σ^{54} em *V.cholerae*, *Aeromonashydrophila*, e *P.aeruginosa* (Bernard et al. 2010). Também há um relato de regulação pelo fator sigma alternativo de resposta geral a estresse ou de fase estacionária RpoS (σ^S) em *Y. pseudotuberculosis* (Guan et al. 2015). Em nenhum dos casos descritos a regulação ocorre por fatores sigma do grupo 4, ou seja, fatores sigma de Função Extracitoplásmica (ECF), como o SigF em *Xac*. O SSVI é encontrado em algumas poucas espécies do gênero *Xanthomonas* e, em todos os casos, o cluster gênico do SSVI está associado a genes homólogos a *xac4128* e *xac4127*, indicando que o mecanismo de regulação aqui descrito é conservado nas espécies do gênero.

Para *V. cholerae* foi relatado que a regulação positiva do σ^{54} ocorre apenas sobre dois grupamentos gênicos do SSVI, os *operons* hcp e o vgrG3, que codificam proteínas secretadas do SSVI. Não foi observada por RNA-Seq e CHIP-Seq alteração da expressão do principal grupamento que codifica os componentes estruturais do sistema (Bernard et al. 2010; Dong & Mekalanos 2012). O contrário foi observado neste trabalho em *Xac*, os resultados de RNA-Seq mostram que SigF está envolvido na regulação de todos os componentes estruturais do SSVI, localizados em dois grupamentos gênicos.

Em *Porphyromonas gingivalis*, foi recentemente observada a regulação através do fator sigma ECF SigP de genes que codificam componentes do sistema de secreção do tipo 9 desta bactéria. Este fator sigma ECF interage com PorX, uma proteína reguladora de resposta (RR) que não possui um domínio típico de interação com o DNA. Os pesquisadores observaram que no mutante de PorX, o ECF SigP é escassamente detectado e foi sugerido que PorX confere estabilidade para SigP. A PorX é uma proteína que compõe um sistema de dois componentes junto com a proteína sensora histidina quinase (HK) PorY. Portanto, o sistema de dois componentes PorYX regula a atividade deste fator sigma que, por sua vez, atua na transcrição do sistema de secreção do tipo 9 (Kadowaki et al. 2016).

Para SigF em *Xac*, presume-se com os dados obtidos que o controle da sua atividade sobre os genes do SSVI esteja relacionado a um mecanismo de fosforilação direta. Até o momento, não há relatos de ativação de fator sigma ECF dependente de fosforilação. Os mecanismos melhor compreendidos de ativação da atividade de fatores sigmas ECFs, em

geral, envolvem a inativação de seu fator anti-sigma na presença de um sinal indutor, através de proteólise, mudança conformacional ou ligação de anti-anti-sigma (revisado em Mascher 2013).

Dentre os membros da família σ^{70} , o grupo ECF é o maior, o mais diverso e que apresenta maior diversidade de mecanismos de regulação, alguns deles já são bem conhecidos e estudados. O artigo de Mascher (2009) descreve uma classificação para os fatores sigma do grupo 4 com base em análises filogenéticas, que levaram em consideração a similaridade nas sequências, mecanismos de regulação de sua atividade pela associação ou não a fatores anti-sigma, conservação do contexto genômico e potenciais motivos de ligação a promotores alvo. Para o grupo de ECF43, os genes que codificam os fatores sigma estão próximos a um gene que codifica uma proteína com domínio de Ser/Thr quinases e não há um fator anti-sigma aparente associado ao operon (Starón et al. 2009). Com base nesta evidência obtida a partir de análise *in silico* de genomas, os autores sugeriram a hipótese de que a atividade destes ECFs seja controlada por mecanismo de fosforilação direta mediada pela proteína codificada pelo gene vizinho (Mascher 2013; Pinto & Mascher 2016). O gene *sigF* é um membro deste grupo e apresenta o contexto genômico típico. Os dados obtidos neste trabalho são a primeira evidência experimental de ativação de um fator sigma ECF por modificação pós-traducional pela adição de grupo fosfato. A expressão diferencial de genes foi detectada no transcriptoma apenas na linhagem com a cópia extra de *sigF* que apresenta mutação que mimetiza fosforilação, não sendo verificada nenhuma variação significativa na expressão gênica pela super-expressão da cópia selvagem. A cópia de SigF mimetizando fosforilação que mostrou ser funcional foi a que teve seu resíduo de treonina 51 alterado para ácido glutâmico, indicando que este resíduo seja o receptor de grupo fosfato. Além destes ensaios genéticos, resultado bioquímico preliminar de espectrometria de massas mostrou fosforilação de 5% de SigF pela proteína PknB. Para confirmar de forma definitiva este modelo, será necessário realizar novos ensaios de fosforilação *in vitro* otimizando as condições, pela adição de $MnCl_2$ e pré-incubação de PknB em tampão de fosforilação, para obter grande fração desta proteína em estado fosforilado.

Os dados de RNA-seq revelaram que, além dos genes do SSVI, SigF regula a transcrição de duas proteínas da família MsrA de oxidoredutases, que atuam na resposta a estresse oxidativo, e duas proteínas com atividade de chaperonas, com papel no enovelamento de proteínas. Apesar disso, não observamos diferenças estatisticamente significativas na sensibilidade da linhagem mutante em *sigF* a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio em comparação a linhagem selvagem. Uma possibilidade a ser testada é de ativação da

resposta de SigF por algum agente que cause oxidação específica em resíduos de metionina, já que as duas oxidoredutases identificadas tem atividade de metionina sulfóxido redutase, capazes de reparar a oxidação de metioninas, causada principalmente por ácido hipocloroso. Este agente é produzido a partir da reação de H_2O_2 com cloreto por mieloperoxidases liberadas no fagossomo (Gray et al. 2013). Assim, a resistência de *Xac* em competição por *D. discoideum* pode estar relacionada a sua capacidade de resposta a espécies reativas de cloro (RCS) de forma a complementar ou auxiliar o papel do SSVI.

Além dos genes que codificam componentes do SSVI e os genes de resposta a alterações na homeostase de proteínas descritos acima, identificamos na análise de transcriptoma o gene *xac4136*, que codifica uma proteína com domínio de fascina. Este foi o único gene regulado por SigF dentre aqueles que estão localizados entre os dois *clusters* gênicos do SSVI (Figura 36). Fascinas são proteínas eucarióticas que se ligam a actina e promovem a organização de citoesqueleto, em resposta a sinais específicos. Interessante destacar que o SSVI de *V.cholerae* possui uma proteína VgrG1 com domínio ACD que é translocada para o citoplasma de *D. discoideum* e atua na reorganização de estruturas de actina, sendo essencial para a resistência a predação pela ameba já que age na G-actina levando a despolimerização do filamento de actina e a perda da capacidade fagocítica (Pukatzki et al. 2006; Ma et al. 2009; Durand et al. 2012). Assim, sugerimos a hipótese de que a proteína codificada por *xac4136* seja secretada pelo SSVI de *Xac*, atuando na reorganização do citoesqueleto de actina de *D. discoideum* e auxiliando no escape da bactéria a predação pela ameba. Ensaio de resistência a predação por *D. discoideum* foram realizados usando-se uma linhagem mutante em *xac4136*, porém, não se observou diferenças fenotípicas em relação a linhagem selvagem de *Xac* (Santos, EB, dados não publicados). Porém este resultado não exclui a possibilidade de *xac4136* ser uma das toxinas secretadas pelo SSVI, já que os sistemas de secreção, normalmente, secretam mais do que uma toxina e pode haver sobreposição de função entre elas. Assim, a deleção de uma delas em *Xac* não seria suficiente para a bactéria perder a resistência a *D. discoideum*.

Apesar dos dados de expressão diferencial mostrarem que SigF regula apenas um gene candidato a toxina secretada pelo SSVI, outros possíveis candidatos foram identificados pela análise do transcriptoma de *sigL⁺⁺*. Os ensaios realizados com a linhagem *sigL⁺⁺* tinham como finalidade avaliar sobreposição de função entre SigL e SigF e/ou regulação de um pelo outro, já que estes fatores sigma são codificados por genes vizinhos em *Xac*. Os dados obtidos revelam que ambos têm *regulons* bem distintos. No entanto, o mesmo estímulo pode

desencadear a resposta por ambos, conforme demonstrado em *E.coli* para os fatores σ^E e σ^H , que juntos formam o *stimulon* de choque térmico nesta bactéria (Schumann 2016). Assim como para SigF e para os genes do SSVI, observou-se aumento na expressão do *sigL* durante o crescimento epifítico de *Xac* (CESETI LM, dados não publicados), o que indica a possibilidade da resposta a um único sinal ser mediada por estes dois fatores sigma ECFs. Estudos no nosso laboratório estão sendo realizados para confirmação desta hipótese.

Os demais candidatos a toxinas secretadas pelo SSVI são as proteínas codificadas pelos genes *xac4132* e *xac4133* diferencialmente expressos em *sigL*⁺⁺. O primeiro gene codifica uma fosfatase ácida. Proteínas desta família estão envolvidas na degradação de ácido fítico para obtenção de fosfato na bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Chatterjee et al. 2003). Por outro lado, o ácido fítico também pode exercer um papel bacteriostático, devido a sua atividade quelante de metais. Em *Legionella pneumophila*, a deleção de uma fosfatase (*lppA*) reduz a capacidade de replicação dentro da ameba *A.castellanii* ou em *D. discoideum*, devido ao aspecto bacteriostático do fitato produzido pelo hospedeiro. Em *L.pneumophila* esta fosfatase é secretada por seu SSVI e se mostrou necessária para neutralizar a ação do fitato como componente bacteriostático intracelular do hospedeiro (Weber et al. 2014). Embora o ensaio com ácido fítico como agente bacteriostático usando a linhagem $\Delta sigF$ tenha mostrado que SigF e, portanto, o SSVI não tenha papel essencial para a sobrevivência da bactéria, fica em aberto quanto a uso deste composto como fonte de fosfato ou como sideróforo de ferro. Maiores investigações precisam ser feitas sobre a proteína codificada por *xac4132* para identificar sua possível secreção pelo SSVI e sua função em *Xac*.

O gene *xac4131*, que codifica um receptor dependente de TonB da família FecA, também teve sua expressão aumentada em *sigL*⁺⁺. Em geral, FecA está associado a um fator sigma ECF e um anti-sigma, tem papel tanto no transporte de ferro como na sinalização de transdução de sinal através de seu domínio amino-terminal que permite sua interação com o anti-sigma FecR na membrana citoplásmica e, quando isto ocorre, o sigma FecI é liberado (Enz et al. 2000; Braun et al. 2006). Um estudo funcional deste gene descreve um possível papel na indução da resposta hipersensível em plantas não-hospedeiras de *Xac* (AINI et al., 2010). Neste estudo foi demonstrado que os genes *xac4129*, *xac4130* e *xac4131* tem sua expressão aumentada na carência de ferro e em linhagem mutante no gene que codifica a proteína Fur (Aini et al. 2010). Fur (do inglês “**F**erric **U**ptake **R**egulator”) é um repressor transcricional que, uma vez ligado a Fe(2+), reprime a expressão de genes para captação de Fe(3+) (Troxell & Hassan 2013). A repressão por Fur pode ser responsável pela manutenção dos níveis basais de *xac4130* na linhagem *sigL*⁺⁺, como mostram os dados de RNA-seq. O

papel de SigL na resposta a carência de ferro será melhor definido pela obtenção de linhagem mutante e caracterização fenotípica nestas condições. Os resultados aqui descritos apontam para a função de SigL na regulação de algumas toxinas secretadas pelo SSVI, enquanto SigF atua na regulação de componentes estruturais e de outras possíveis toxinas. Sabe-se que a carência de ferro é uma das condições encontradas por bactérias durante a interação com o hospedeiro, sendo também um dos sinais percebidos para a indução de genes de virulência (Litwin & Calderwood 1993). De forma similar, a carência de ferro pode ser uma das condições detectadas por *Xac* após internalização pela ameba, desencadeando a resposta mediada por SigL e a indução de toxinas para defesa.

Uma característica importante de fatores sigma ECF é a sua autoregulação positiva através do reconhecimento de sua própria região promotora (Chandrangsu & Helmann 2014). No entanto, esta característica não foi observada em ambos os fatores sigma, SigF e SigL. Uma vez que se esperava que os genes *pknB* e *xac4130*, respectivamente, em possíveis *operon* com estes sigmas se mostrassem diferencialmente expressos na análise do transcriptoma. Esta questão precisa ser melhor investigada, pois se o *operon* de *xac4130* estiver reprimido como dito anteriormente, a super-expressão de SigL a partir de cópia extra não seria suficiente para revelar a autoregulação, pois estaria sendo reprimido por Fur.

Como perspectivas futuras para continuação deste trabalho pretendemos elucidar o mecanismo de ativação de ECF por fosforilação, assim como identificar o sinal que desencadeia a resposta via SigF e possíveis reguladores da atividade de PknB. Uma linhagem mutante em *pknB* está em fase de construção, com o objetivo de verificar se apresenta o mesmo fenótipo $\Delta sigF$ e da linhagem mutante de deleção do SSVI, Δhcp . Para confirmar nosso modelo, realizaremos ensaios de complementação com a construção que mimetiza o sigma fosforilado (*sigF++T51E*).

6) CONCLUSÕES

Poucos são os estudos publicados nas revistas científicas sobre fatores sigmas do gênero *Xanthomonas*. Os trabalhos já realizados envolveram a caracterização, principalmente, dos fatores sigmas RpoN, RpoE e RpoH. A pesquisa desenvolvida neste trabalho possibilitou uma maior compreensão sobre a natureza de um dos nove fatores sigma ECF na fisiologia de *Xanthomonas citri* pv. *citri*. Além disto, um novo mecanismo de regulação de um fator sigma ECF pode ser fortemente sugerido pelos resultados experimentais obtidos neste trabalho. Os enunciados abaixo são referentes as inferências oriundas deste estudo. Portanto, os dados experimentais anteriormente apresentados propõem que:

- ψ O *sigF* não é essencial para a infecção de plantas de citros e não atua na adesão a superfícies bióticas e abióticas;
- ψ As respostas a radiação UVC, a ácido fítico como agente bacteriostático e a deficiência de ferro não são mediadas pelo SigF.
- ψ O SigF está envolvido direta ou indiretamente na transcrição dos genes que codificam o sistema de secreção do tipo VI;
- ψ Este fator sigma ECF, provavelmente, sofre regulação direta pela PknB codificada pelo gene vizinho *xac4127*, sendo o resíduo 51 o alvo da fosforilação.
- ψ SigF é essencial paracompetição de *Xacoma* ameba *Dictyostelium discoideum*.

7) REFERÊNCIAS

- A Darst, S., 2001. Bacterial RNA polymerase. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(2), pp.155–162. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X00001858>.
- Aini, L.Q., Hirata, H. & Tsuyumu, S., 2010. A TonB-dependent transducer is responsible for regulation of pathogenicity-related genes in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of General Plant Pathology*, 76(2), pp.132–142.
- Astua-Monge, G. et al., 2005. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of bacteriology*, 187(3), pp.1201–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659697> [Accessed January 26, 2017].
- Atsushi, M. et al., 1994. Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene*, 146(1), pp.47–56. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037811199490832X> [Accessed January 30, 2017].
- Aubert, D.F., Flanagan, R.S. & Valvano, M.A., 2008. A Novel Sensor Kinase-Response Regulator Hybrid Controls Biofilm Formation and Type VI Secretion System Activity in *Burkholderia cenocepacia*. *INFECTION AND IMMUNITY*, 76(5).
- Bakal, C.J. & Davies, J.E., 2000. No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. *Trends in Cell Biology*, 10(1), pp.32–38.
- Barchinger, S.E. & Ades, S.E., 2013. Regulated Proteolysis: Control of the *Escherichia coli* σ^E -Dependent Cell Envelope Stress Response. In D. A. Dougan, ed. *Regulated Proteolysis in Microorganisms*. Springer Netherlands, pp. 129–160. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479440> [Accessed January 29, 2017].
- Battesti, A., Majdalani, N. & Gottesman, S., 2011. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli* *. *Annu. Rev. Microbiol.*, 65, pp.189–213.
- Behlau, F. & Belasque Júnior, J., 2014. *Cancro cítrico: a doença e seu controle*, Araraquara: Fundecitrus.
- Bernard, C.S. et al., 2010. Nooks and crannies in type VI secretion regulation. *Journal of Bacteriology*, 192(15), pp.3850–3860.
- Blatter, E.E. et al., 1994. Domain Organization of RNA Polymerase α Subunit: C-Terminal 85 Amino Acids Constitute a Domain Capable of Dimerization and DNA Binding. *Cell*, 78, pp.889–896.
- Boyer, F. et al., 2009. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10(1), p.104. Available at: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-104> [Accessed January 30, 2017].
- Braun, V., Mahren, S. & Sauter, A., 2006. Gene Regulation by Transmembrane Signaling. *BioMetals*, 19(2), pp.103–113. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10534-005-8253-y>.
- Brooks, B.E. & Buchanan, S.K., 2008. Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9), pp.1930–1945.
- Brunings, A.M. & Gabriel, D.W., 2003. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4(3), pp.141–157.

- Buck, M. et al., 2000. The Bacterial Enhancer-Dependent $\zeta 54(\zeta N)$ Transcription Factor. *Journal of bacteriology*, 54(15), pp.4129–4136.
- Burgess, R.R. et al., 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221, pp.43–46.
- Burgess, R.R., 1971. RNA polymerase. *Ann.Rev.Biochem.*, 40, pp.711–740.
- Burgess, R.R., 1969. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *The Journal of biological chemistry*, 244(22), pp.6168–6176.
- Büttner, D. & Bonas, U., 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), pp.107–133. Available at: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x> [Accessed January 30, 2017].
- Campagne, S. et al., 2014. Structural basis for -10 promoter element melting by environmentally induced sigma factors. *Nature Publishing Group*, 21(3).
- Campagne, S., Allain, F.H.T. & Vorholt, J.A., 2015. Extra Cytoplasmic Function sigma factors, recent structural insights into promoter recognition and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 30, pp.71–78.
- Chandrangsu, P. & Helmann, J.D., 2014. Sigma Factors in Gene Expression. In *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0003829>.
- Chatterjee, S., Sankaranarayanan, R. & Sonti, R. V, 2003. PhyA, a Secreted Protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Is Required for Optimum Virulence and Growth on Phytic Acid as a Sole Phosphate Source. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(11), pp.973–982. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.2003.16.11.973>.
- Clarke, M., 2010. Recent insights into host-pathogen interactions from *Dictyostelium*. *Cellular Microbiology*, 12(3), pp.283–291.
- Costa, T.R.D. et al., 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*.
- Cousin, C. et al., 2013. Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. *FEMS Microbiology Letters*, 346(1), pp.11–19.
- Dong, T.G. & Mekalanos, J.J., 2012. Characterization of the RpoN regulon reveals differential regulation of T6SS and new flagellar operons in *Vibrio cholerae* O37 strain V52. *Nucleic Acids Research*, 40(16), pp.7766–7775. Available at: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks567> [Accessed January 30, 2017].
- Dufour, Y.S., Landick, R. & Donohue, T.J., 2008. Organization and Evolution of the Biological Response to Singlet Oxygen Stress. *Journal of Molecular Biology*, 383(3), pp.713–730.
- Durand, E. et al., 2012. Crystal structure of the VgrG1 actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* type VI secretion system. *The Journal of biological chemistry*, 287(45), pp.38190–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22898822> [Accessed January 30, 2017].
- Dworkin, J., 2015. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 24, pp.47–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.005>.
- Ebright, R.H., 2000. RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and

- eukaryotic RNA polymerase II. *Journal of molecular biology*, 304(5), pp.687–98. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600943092>.
- Enz, S. et al., 2000. Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *Journal of bacteriology*, 182(3), pp.637–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10633096> [Accessed January 30, 2017].
- Erickson, J.W. & Gross, C.A., 1989. Identification of the sigma E subunit of Escherichia coli RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes & Development*, 3(9), pp.1462–1471. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.3.9.1462> [Accessed January 29, 2017].
- Eschenfeldt, W.H. et al., 2009. A Family of LIC Vectors for High-Throughput Cloning and Purification of Proteins 1. *Methods in Molecular Biology*, 498, pp.105–115.
- Feklistov, A. et al., 2014. Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective. *Annual review of microbiology*, pp.357–376. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002089>.
- Francez-Charlot, A. et al., 2009. Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), pp.3467–3472. Available at: <http://www.pnas.org/content/106/9/3467.abstract>.
- Francez-Charlot, A. et al., 2015. The general stress response in Alphaproteobacteria. *Trends in Microbiology*, 23(3), pp.164–171. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.006>.
- 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>.
- FUNDECITRUS, 2008. Cancro cítrico - Medidas Essenciais de Controle. *Manual Técnico*, pp.1–12. Available at: http://www.fundecitrus.com.br/pdf/manuais/cancro_essenciais_6.pdf.
- Galyov, E.E. et al., 1993. A secreted protein kinase of Yersinia pseudotuberculosis is an indispensable virulence determinant. *Nature*, 361(6414), pp.730–732. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/361730a0> [Accessed January 30, 2017].
- Gao, W. et al., 2006. Knock-out of SO1377 gene, which encodes the member of a conserved hypothetical bacterial protein family COG2268, results in alteration of iron metabolism, increased spontaneous mutation and hydrogen peroxide sensitivity in Shewanella oneidensis MR-1. *BMC genomics*, 7, p.76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1468410&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Garcia, E. et al., 1977. The product of a newly identified gene, glnF, is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella (regulation of enzyme synthesis/covalent modification/adenylation). *Genetics*, 74(4), pp.1662–1666.
- Garnak, M. & Reeves, H., 1979. Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. *Science*, 203(4385), pp.1111–1112. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.34215> [Accessed January 30, 2017].
- Ghosh, T., Bose, D. & Zhang, X., 2010. Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), pp.611–627.
- Gnanamanickam, S.S. & Immanuel, J.E., 2006. Epiphytic bacteria, their ecology and functions. In *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 131–153. Available at:

- http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-4538-7_4 [Accessed January 30, 2017].
- Gómez-Santos, N. et al., 2011. CorE from *Myxococcus xanthus* Is a Copper-Dependent RNA Polymerase Sigma Factor J. Casadesús, ed. *PLoS Genetics*, 7(6), p.e1002106. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002106> [Accessed January 30, 2017].
- Gottig, N. et al., 2010. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp.196–204.
- Gourion, B., Rossignol, M. & Vorholt, J.A., 2006. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), pp.13186–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926146> [Accessed January 30, 2017].
- Gourse, R.L., Ross, W. & Gaal, T., 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: The role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Molecular Microbiology*, 37(4), pp.687–695. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01972.x>.
- Gray, M.J., Wholey, W.-Y. & Jakob, U., 2013. Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), pp.141–160. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-102912-142520> [Accessed January 30, 2017].
- Grindheim, A.K. et al., 2014. Effect of serine phosphorylation and ser25 phospho-mimicking mutations on nuclear localisation and ligand interactions of annexin A2. *Journal of Molecular Biology*, 426(13), pp.2486–2499. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.019>.
- Gruber, T.M. et al., 2001. Binding of the initiation factor $\sigma 70$ to core RNA polymerase is a multistep process. *Molecular Cell*, 8(1), pp.21–31.
- Gruber, T.M. & Gross, C.A., 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual review of microbiology*, 57(1), pp.441–66. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.57.030502.090913%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527287>.
- Guan, J. et al., 2015. Roles of RpoS in *Yersinia pseudotuberculosis* stress survival, motility, biofilm formation and type VI secretion system expression. *Journal of Microbiology*, 53(9), pp.633–642. Available at: <http://www.springerlink.com/content/120956>. [Accessed January 20, 2017].
- Guldimann, C. et al., 2016. Resilience in the Face of Uncertainty: Sigma Factor B Fine-Tunes Gene Expression To Support Homeostasis in Gram-Positive Bacteria D. W. Schaffner, ed. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), pp.4456–4469. Available at: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00714-16> [Accessed January 19, 2017].
- Guzman, L.M. et al., 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose These include: Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P BAD Promoter. *Journal of bacteriology*, 177(14), pp.4121–4130. Available at: <http://jb.asm.org/content/177/14/4121.short>.
- Haapalainen, M. et al., 2012. Hcp2, a Secreted Protein of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*, Is Required for Fitness for Competition against Bacteria and Yeasts. *Journal of Bacteriology*, 194(18), pp.4810–4822. Available at: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00611-12> [Accessed January 24, 2017].
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular*

- biology*, 166(4), pp.557–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791> [Accessed January 26, 2017].
- Haugen, S.P., Ross, W. & Gourse, R.L., 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature Reviews Microbiology*, (6), pp.507–519.
- Haugen, S.P., Ross, W. & Gourse, R.L., 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nature reviews. Microbiology*, 6(7), pp.507–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1912>.
- Heckel, B.C. et al., 2014. *Agrobacterium tumefaciens* ExoR controls acid response genes and impacts exopolysaccharide synthesis, horizontal gene transfer, and virulence gene expression. *Journal of Bacteriology*, 196(18), pp.3221–3233. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982308> [Accessed January 24, 2017].
- Helmann, J.D., 2016. *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope. *Current Opinion in Microbiology*, 30, pp.122–132.
- Helmann, J.D., 2002. *The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors*,
- Van der Henst, C. et al., 2016. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *The ISME Journal*, 10(4), pp.897–910. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.165> <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/ismej.2015.165>.
- Hirschman, J. et al., 1985. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(22), pp.7525–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999766> [Accessed January 28, 2017].
- Ho, T.D. & Ellermeier, C.D., 2012. Extra cytoplasmic function σ factor activation. *Current Opinion in Microbiology*, 15(2), pp.182–188. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2012.01.001>.
- Hood, R.D. et al., 2010. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host & Microbe*, 7(1), pp.25–37.
- Hsu, L.M., 2002. Promoter clearance and escape in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1577(2), pp.191–207.
- Hunt, T.P. & Magasanik, B., 1985. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(December), pp.8453–8457.
- Jacob, T.R. et al., 2011. Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. *Biotechnology Letters*, 33(6), pp.1177–1184. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-011-0552-5> [Accessed January 26, 2017].
- Kadowaki, T. et al., 2016. A two-component system regulates gene expression of the type IX secretion component proteins via an ECF sigma factor. *Scientific Reports*, 6, p.23288. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep23288> [Accessed January 30, 2017].
- Lane, W.J. et al., 2006. The Structural Basis for Promoter –35 Element Recognition by the Group IV σ Factors J. Kadonga, ed. *PLoS Biology*, 4(9), p.e269. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0040269> [Accessed January 29, 2017].

- Laportes, D.C. & Chung, T., 1985. A Single Gene Codes for the Kinase and Phosphatase Which Regulate Isocitrate Dehydrogenase*. , 26028, pp.15291–15297.
- Lee, D.J., Minchin, S.D. & Busby, S.J.W.W., 2012. Activating transcription in bacteria. *Annual review of microbiology*, 66(1), pp.125–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726217>.
- Litwin, C.M. & Calderwood, S.B., 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(2), pp.137–149. Available at: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.6.2.137> [Accessed January 30, 2017].
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), pp.402–408. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629> [Accessed January 26, 2017].
- Lonetto, M.A. et al., 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase or factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Microbiology*, 91, pp.7573–7577.
- Lonetto, M., Gribskov, M. & Gross, C.A., 1992. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of Bacteriology*, 174(12), pp.3843–3849. Available at: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.174.12.3843-3849.1992> [Accessed January 13, 2017].
- Lourenço, R.F., Kohler, C. & Gomes, S.L., 2011. A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of general stress response in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, 80(6), pp.1598–1612. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2011.07668.x> [Accessed February 20, 2017].
- Ma, A.T. et al., 2009. Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell Host & Microbe*, 5(3), pp.234–243.
- Malik, S., Zalenskaya, K. & Goldfarb, A., 1987. Nucleic Acids Research Competition between sigma factors for core RNA polymerase. , 15(20).
- Martin, D.W., Holloway, B.W. & Deretic, A. V., 1993. Characterization of a Locus Determining the Mucoid Status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU Shows Sequence Similarities with a *Bacillus* Sigma Factor. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 175(4), pp.1153–1164.
- Mascher, T., 2013. Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) s factors. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), pp.148–155. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.001>.
- Merrick, M.J., 1993. In a class of its own- the RNA polymerase sigma factor sigma 54. *Molecular Microbiology*, 10(5), pp.903–909. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00961.x> [Accessed January 13, 2017].
- Mieczkowski, C., Iavarone, A.T. & Alber, T., 2008. Auto-activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* PknB receptor Ser/Thr kinase. *The EMBO journal*, 27(23), pp.3186–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008858> [Accessed January 26, 2017].
- Moreira, L.M. et al., 2004. Comparative Genomics Analyses of Citrus-Associated Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), pp.163–184. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140310>.
- Müller, D.B. et al., 2016. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annual*

- Review of Genetics*, 50(1), pp.211–234. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-120215-034952> [Accessed January 30, 2017].
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S. & Inouye, M., 1991. A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*, 67(5), pp.995–1006. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867491903726> [Accessed April 20, 2017].
- Murakami, K., 2015. Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules*, 5(2), pp.848–864. Available at: <http://www.mdpi.com/2218-273X/5/2/848/>.
- Murakami, K.S. & Darst, S.A., 2003. Bacterial RNA polymerases: The whole story. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(1), pp.31–39.
- Österberg, S., del Peso-Santos, T. & Shingler, V., 2011. Regulation of alternative sigma factor use. *Annu Rev Microbiol*, 65, pp.37–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21639785>.
- Paget, M.S., 2015. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), pp.1245–65. Available at: <http://www.mdpi.com/2218-273X/5/3/1245/htm>.
- Paget, M.S.B. et al., 2001. Mutational analysis of RsrA, a zinc-binding anti-sigma factor with a thiol-disulphide redox switch. *Molecular Microbiology*, 39(4), pp.1036–1047. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2001.02298.x> [Accessed January 30, 2017].
- Paget, M.S.B. & Helmann, J.D., 2003. The sigma70 family of sigma factors. *Genome biology*, 4(1), p.203. Available at: [/pmc/articles/PMC151288/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC151288/?report=abstract).
- Paget, M.S.B., Leibovitz, E. & Buttner, M.J., 1999. A putative two-component signal transduction system regulates sigmaE, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 33(1), pp.97–107. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01452.x> [Accessed January 30, 2017].
- Park, S.T., Kang, C.-M. & Husson, R.N., 2008. Regulation of the SigH stress response regulon by an essential protein kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), pp.13105–13110. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=18728196&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1073/pnas.0801143105>.
- Pereira, S.F.F., Goss, L. & Dworkin, J., 2011. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(1), pp.192–212. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3063355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>.
- Pinto, D. & Mascher, T., 2016. The ECF classification: a phylogenetic reflection of the regulatory diversity in the extracytoplasmic function sigma factor protein family. *Stress and environmental control of gene expression in bacteria*, pp.64–96. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119004813.ch7> [Accessed January 29, 2017].

- Poplawsky, A.R., Urban, S.C. & Chun, W., 2000. Biological Role of Xanthomonadin Pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), pp.5123–5127. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11097878> [Accessed January 30, 2017].
- Pukatzki, S. et al., 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), pp.1528–1533. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1345711&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 24, 2017].
- Ried, J.L. & Collmer, A., 1987. An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene*, 57(2–3), pp.239–246.
- Ruff, E.F., Record, M.T. & Artsimovitch, I., 2015. Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*, 5(2), pp.1035–62. Available at: <http://www.mdpi.com/2218-273X/5/2/1035/htm>.
- Saier, M.H. et al., 2006. Protein Secretion and Membrane Insertion Systems in Gram-Negative Bacteria. *Journal of Membrane Biology*, 214(1–2), pp.75–90. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00232-006-0049-7> [Accessed January 30, 2017].
- Sambrook, J. & Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauviac, L. et al., 2007. An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 189(11), pp.4204–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400745> [Accessed January 30, 2017].
- Savitsky, P. et al., 2010. High-throughput production of human proteins for crystallization : The SGC experience. *Journal of Structural Biology*, 172(1), pp.3–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.008>.
- Schumann, W., 2016. Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress and Chaperones*, 21(6), pp.959–968.
- da Silva, a C.R. et al., 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417(6887), pp.459–463.
- Sluys, M.A. Van et al., 2002. COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS OF PLANT-ASSOCIATED BACTERIA. *Annu. Rev. Phytopathol*, 40, pp.169–89. Available at: www.annualreviews.org [Accessed January 17, 2017].
- Souza, D.P. et al., 2015. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun*, 6, p.6453. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743609>.
- Stall, R.E. et al., 1993. Ecology of plant pathogenic xanthomonads. In *Xanthomonas*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 265–299. Available at: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-011-1526-1_5.
- Staroń, A. et al., 2009. The third pillar of bacterial signal transduction: Classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. *Molecular Microbiology*, 74(3), pp.557–581.
- Sutherland, I.W., 1993. Xanthan. In J. G. Swings & L. E. Civetta, eds. *Xanthomonas*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 363–388. Available at:

- http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-011-1526-1_8 [Accessed January 27, 2017].
- Swings, J.G. & Civetta, L.E., 1993. *Xanthomonas*. J. G. Swings & E. L. Civerolo, eds., Dordrecht: Springer Netherlands. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-1526-1>.
- Troxell, B. & Hassan, H.M., 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, p.59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24106689> [Accessed January 30, 2017].
- Weber, S. et al., 2014. A type IV translocated Legionella cysteine phytase counteracts intracellular growth restriction by phytate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), pp.34175–34188.
- Whitmore, S.E. & Lamont, R.J., 2012. Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *International journal of oral science*, 4(1), pp.1–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3412661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wösten, M.M., 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS microbiology reviews*, 22(3), pp.127–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9818380> [Accessed January 13, 2017].
- Young, T.A. et al., 2003. Structure of Mycobacterium tuberculosis PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nature Structural Biology*, 10(3), pp.168–174. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsb897> [Accessed January 26, 2017].
- Zeng, J. & Spiro, S., 2013. Finely tuned regulation of the aromatic amine degradation pathway in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 195(22), pp.5141–5150.
- Zhang, G. et al., 1999. Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, 98(6), pp.811–824.

8) ANEXOS

Aprovação de projeto pela CIBio

INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto CIBio 2014/03 - O Sistema de Secreção do tipo VI de *Xanthomonas citri* pv *citri*: função, regulação e substratos secretados, cuja pesquisadora responsável é a Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez e a pós-graduanda Lídia dos Passos Lima, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
02 de fevereiro de 2016.



Profa. Dra. HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA
Presidente da CIBio
Instituto de Biologia - UNICAMP

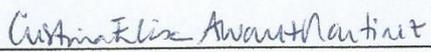
Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **CARACTERIZAÇÃO DE FATOR SIGMA DE FUNÇÃO EXTRACITOPLASMÁTICA SigF DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22 de maio de 2017.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Lidia dos Passos Lima**
RG n.º 44.773.638-3

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Cristina Elisa Alvarez-Martinez**
RG n.º 06857882-2