



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELIANE SILVA DE SANTANA

ANÁLISE DO EFEITO DO REGULADOR TRANSCRICIONAL
TagK NA REGULAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI
DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ANALYSIS OF THE EFFECT OF THE TRANSCRIPTIONAL
REGULATOR TagK ON THE REGULATION OF THE TYPE VI
SECRETION SYSTEM OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

CAMPINAS

2021

ELIANE SILVA DE SANTANA

**ANÁLISE DO EFEITO DO REGULADOR TRANSCRICIONAL TagK
NA REGULAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI DE
Xanthomonas citri subsp. *citri***

**ANALYSIS OF THE EFFECT OF THE TRANSCRIPTIONAL
REGULATOR TagK ON THE REGULATION OF THE TYPE VI
SECRETION SYSTEM OF *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*

*Dissertation presented to the Institute of Biology
of the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the degree of
Master in Genetics and Molecular Biology in the
area of Microbiology*

ORIENTADORA: CRISTINA ELISA ALVAREZ-MARTINEZ

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ELIANE SILVA DE
SANTANA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CRISTINA ELISA
ALVAREZ-MARTINEZ

**CAMPINAS
2021**

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

Santana, Eliane Silva de, 1990-
Sa59a Análise do efeito do regulador transcricional TagK na regulação do sistema de secreção do tipo VI de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Eliane Silva de Santana. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

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

1. Sistemas de secreção do tipo VI. 2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 3. Fator de transcrição AraC. 4. Elementos reguladores de transcrição. I. Alvarez Martinez, Cristina Elisa, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of the effect of the transcriptional regulator TagK on the regulation of the type VI secretion system of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Palavras-chave em inglês:

Type VI secretion systems

Xanthomonas citri subsp. *citri*

AraC transcription fator

Regulatory elements, transcriptional

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Cristina Elisa Alvarez Martinez [Orientador]

Marcelo Brocchi

Regina Lúcia Baldini

Data de defesa: 10-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2328-200X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7492895897082378>

Campinas, 10 de dezembro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez-Martinez (Orientadora)

Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

Dedico esse trabalho a minha mãe Ana
Maria, ao meu pai, José e a minha irmã,
Alessandra.

AGRADECIMENTOS

À minha família que desde muito cedo me mostrou que a educação era o único caminho para transformar a realidade social em que vivíamos.

A minha orientadora Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez-Martinez pelas discussões científicas, reuniões, orientações, paciência e por ter me recebido em seu laboratório mesmo que eu pudesse dedicar um horário limitado para os trabalhos de bancada.

Aos amigos do laboratório de Genética Bacteriana (Lucas, Lídia, João, Aline, Fernandinha, Bárbara, Juliana e Mateus) que sempre estiveram presente e me auxiliaram em todos os momentos.

Um agradecimento especial para a Lídia, nossos trabalhos se complementaram ao longo do caminho e as discussões e auxílios, principalmente no experimento de RNA seq foram fundamentais para a conclusão da minha dissertação.

Ao laboratório LEVE pelo empréstimo da máquina que RT- qPCR em tempo real.

Ao laboratório do Professor Marcelo Brocchi pelo empréstimo da máquina de RT-qPCR em tempo real e do biofreezer.

Aos membros titulares e suplentes da banca de qualificação Dr. Maxuel Andrade, Professora Dr. Elisabeth Bilsland, Professor Dr. Marcelo Brocchi e Professora Dr. Regina Baldini e aos membros titulares e suplentes da banca de defesa Professor Dr. Marcelo Brocchi e Professora Dr. Regina Baldini, Dr. Maxuel Andrade e Professor Domingos da Silva Leite.

As facilities: Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP- USP) e Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD- UNICAMP).

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (FAPESP- 2018/01852-4) e ao Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPEX).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu companheiro de vida (Jonathan Bradnick) que sempre entendeu minhas ausências e me apoiou nas minhas decisões.

Aos meus amigos de graduação e da vida (Ellen Nunes e Caique Malospirito).

Aos meus amigos da Creche (CEI Christiano Osório de Oliveira) que sempre que possível me ajudaram e incentivaram.

RESUMO

As bactérias são capazes de perceber o meio biótico e abiótico e se adaptar alterando a expressão gênica. Os fatores de transcrição são proteínas capazes de se ligar a regiões promotoras no DNA aumentando ou diminuindo a eficiência de recrutamento da RNA polimerase e a transcrição dos genes. A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) é fitopatogênica de diversas espécies de citros de importância econômica. Quando em contato com o mesófilo causa o cancro cítrico, doença caracterizada pela presença de lesões em folhas e frutos, reduzindo a qualidade de frutos e a produtividade agrícola. O objetivo deste trabalho foi analisar o papel do fator de transcrição da família AraC/ XylS denominado TagK na expressão dos genes do sistema de secreção do tipo VI (SSVI), maquinaria que atua na translocação de toxinas e proteínas efetoras envolvidas na patogenicidade e competição com organismos procariontes e eucariontes. As análises de filogenia indicaram que TagK, assim como outros reguladores já descritos na literatura, como SoxS, MarA e Rob de *E. coli*, não possui o domínio de ligação a indutor e o domínio de ligação ao DNA no mesmo polipeptídeo e, portanto, precisa de outros reguladores que aumentem ou diminuam sua própria transcrição. Foi possível observar também que as linhagens que possuem o SSVI pertencente ao mesmo clado de *X. citri* tem *tagK* associado ao cluster do SSVI, o que não ocorre com os demais clados. Além disso, a análise de homologia com outros reguladores da família já caracterizados experimentalmente, indicou a presença de resíduos conservados que são importantes para a ligação da proteína ao promotor (S40 e R96) e para manutenção da estrutura terciária (L44, F48, L72, F98, P106). Resultados experimentais indicaram que a superexpressão de *tagK* em *X. citri* promoveu aumento dos níveis de RNA mensageiro de genes essenciais para o funcionamento do SSVI e que foi responsável por regular todos os genes presentes no contexto genômico do SSVI, além do SSV inserido no SSVI de *X. citri*. Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o fator sigma *ecfK* de *X. citri* é essencial para a resistência à predação pela ameba de solo *Dictyostelium discoideum* e para a indução da expressão do SSVI nestas condições. Os resultados obtidos no presente trabalho suportam a hipótese de que TagK atue diretamente na indução da transcrição dos genes do SSVI e, portanto, abaixo de EcfK na via de regulação, já que a superexpressão de *tagK* foi suficiente para restaurar o fenótipo selvagem às linhagens que possuem a deleção do fator sigma *ecfK*. Portanto, de acordo com o modelo proposto, quando *X. citri* recebe o sinal para que o SSVI seja ativado, EcfK se liga a RNA polimerase e ativa

a transcrição de *tagK*, que é o responsável por ativar os genes do SSVI, levando ao acúmulo das proteínas.

ABSTRACT

Bacteria are able to sense the biotic and abiotic environment and to adapt by changing gene expression. Transcription factors are proteins capable of binding to promoter regions in the DNA, increasing or decreasing the efficiency of RNA polymerase recruitment and gene transcription. The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) is phytopathogenic of several economically important citrus species. When in contact with the mesophyll, *X. citri* causes citrus canker, a disease characterized by the presence of lesions on leaves and fruit, which reduces fruit quality and agricultural productivity. The objective of this work was to analyze the role of the AraC/XylS transcription factor denominated TagK in the expression of the type VI secretion system (T6SS), an apparatus that acts in the translocation of toxins and effector proteins involved in pathogenicity and competition with prokaryotic and eukaryotic organisms. Phylogeny analyses indicated that, similarly to regulators already described in the literature such as SoxS, MarA and Rob from *E. coli*, TagK does not present the inducer-binding domain and the DNA-binding domain on the same polypeptide, therefore other regulators are required to augment or reduce its own transcription. It was also possible to observe that the strains that have the T6SS belonging to the same *X. citri* clade have *tagK* associated with the T6SS cluster, which does not occur with the other clades. Moreover, homology analysis with other previously experimentally characterized regulators of the family indicated the presence of conserved residues involved in DNA binding (S40 and R96) and tertiary structure stability (L44, F48, L72, F98, P106) in TagK. The experimental results indicated that overexpression of *tagK* in *X. citri* promoted an increase in the mRNA levels of genes required for the functioning of the T6SS, and that it was responsible for regulating all genes present in the genomic context of the T6SS, in addition to the T5SS genes inserted in the T6SS gene cluster of *X. citri*. Previous data from our research group have shown that the *X. citri* sigma factor *ecfK* is essential for resistance to predation by the soil amoeba *Dictyostelium discoideum* and for inducing T6SS expression under these conditions. Results from this work support the hypothesis that TagK acts downstream from EcfK in the signaling cascade that induces the T6SS, since the overexpression of *tagK* was sufficient to restore the wild phenotype to the strains with *ecfK* deletion. According to the proposed model, when *X. citri* receives the signal for T6SS expression, EcfK binds to the RNA polymerase and activates the transcription of *tagK*, which is responsible for activating T6SS genes, leading to protein accumulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Frutos com lesões circulares e marrons características do cancro cítrico.....	16
Figura 2- Esquema da organização gênica do SSVI de <i>X. citri</i>	18
Figura 3- Organização dos SSVI da ordem Xanthomonadales.	20
Figura 4- Estratégia para obtenção da construção de deleção de <i>tagK</i> -	28
Figura 5- Representação esquemática da recombinação homóloga utilizada para obter a linhagem mutante com deleção em fase de <i>tagK</i>	33
Figura 6- Alinhamento de proteínas pertencentes a família AraC.	42
Figura 7- Relação filogenética de TagK e os homólogos com similaridade igual ou maior que 40%.	45
Figura 8- Confirmação da linhagem $\Delta tagK$:.	47
Figura 9- A deleção de <i>tagK</i> não altera a expressão de genes do SSVI:.....	48
Figura 10- A presença de cópia extra de <i>tagK</i> no vetor pBRA promove aumento nos níveis de mRNA de <i>tagK</i> mesmo na ausência do agente indutor arabinose.	49
Figura 11- A superexpressão de <i>tagK</i> aumenta os níveis transcricionais de genes essenciais do SSVI, sem afetar a expressão de <i>ecfK</i>	50
Figura 12- <i>tagK</i> é necessário para a sobrevivência de <i>X. citri</i> em contato com a ameba de solo <i>D. discoideum</i>	52
Figura 13- <i>tagK</i> é induzido durante o contato de <i>X. citri</i> com <i>D. discoideum</i> de forma dependente de EcfK.....	53
Figura 14- <i>tagK</i> é necessário para que ocorra indução de genes essenciais do SSVI durante o cocultivo de <i>X. citri</i> com <i>D. discoideum</i>	54
Figura 15- <i>tagK</i> é suficiente para complementar as linhagens que não possuem o sigma <i>ecfK</i> . ..	55
Figura 16- <i>ecfK</i> é induzido em contato com <i>D. discoideum</i> em linhagens com <i>tagK</i> deletado. ...	56
Figura 17- <i>tagK</i> é capaz de aumentar a expressão de genes essenciais do SSVI mesmo na ausência de <i>ecfK</i>	58
Figura 18- A superexpressão de <i>tagK</i> aumenta a expressão das proteínas Hcp e PAAR	59
Figura 19- Heatmap dos resultados de RNA-Seq de cada uma das réplicas biológicas de cada linhagem analisada.	60
Figura 20- TagK regula positivamente os genes do SSVI.	62
Figura 21- Modelo proposto para regulação do SSVI de <i>X.citri</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Linhagens utilizadas neste trabalho.....	27
Tabela 2-Vetores e construções.....	29
Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	29
Tabela 4- Genes regulados por <i>tagK</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µg	Microgramas
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FT	Fator de transcrição
g/L	Gramas por litro
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	Nanogramas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RT-PCRq	Reação da transcriptase reversa- Reação em cadeia da polimerase quantitativo
SDS- PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
Subsp	Subespécie
SSIII	Sistema de secreção do tipo III
SSV	Sistema de secreção do tipo V
SSVI	Sistema de secreção do tipo VI

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	15
1.2. Sistemas de secreção bacterianos	16
1.3. Regulação gênica bacteriana.....	21
1.4. Fatores de transcrição da família AraC/ XylS	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Análise Filogenética	26
3.2. Linhagens e meios de cultivo.....	26
3.3. Construção dos vetores	27
3.4. Transformação de <i>E. coli</i> e <i>X. citri</i>	31
3.5. Obtenção de Linhagem Mutante de <i>X. citri</i>	31
3.6. Extração de RNA de culturas de <i>X. citri</i>	33
3.7. Síntese de cDNA e ensaio de qRT- PCR.....	34
3.8. Obtenção de Extratos Proteicos Totais e Imunoblot.....	35
3.9. Ensaio de formação de placa de fagocitose	36
3.10. Extração de RNA de <i>X. citri</i> em contato com <i>D. discoideum</i>	37
3.11. Preparo de biblioteca de cDNA e Transcritoma	37
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Análise do fator de transcrição TagK	40
4.2. Construção e caracterização fenotípica de linhagem mutante em <i>tagK</i> e da linhagem superexpressando <i>tagK</i>	46
4.3. Caracterização fenotípica das linhagens superexpressando <i>tagK</i> e <i>ecfK</i> em contato com a ameba de solo <i>Dictyostelium discoideum</i>	50
4.4. Expressão de proteínas em linhagens superexpressando <i>tagK</i> e <i>ecfK</i>	57
4.5. Análise de transcriptoma	59
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são Gram negativas da Classe Gammaproteobacteria, baciliformes, aeróbicas obrigatórias, com temperatura ideal de crescimento entre 25°C e 30°C (AN et al., 2019; BEHLAU, 2014). A maioria das *Xanthomonas* spp produzem xantomonadina, um pigmento que confere às colônias a coloração amarelada e que protege as bactérias da luz visível, sendo importante na sobrevivência epifítica (AN et al., 2019; POPLAWSKY; URBAN; CHUN, 2000). Além disso, essas bactérias possuem como característica a produção de goma xantana, um polissacarídeo importante na formação de biofilmes e sobrevivência da bactéria na superfície da folha (DUNGER et al., 2007), além de ser produzido comercialmente em grande escala para ser utilizado na indústria farmacêutica e de alimentos (AN et al., 2019).

O gênero *Xanthomonas* é composto por 34 espécies de bactérias que causam doenças em aproximadamente 400 plantas distintas, incluindo algumas com grande importância econômica como arroz, tomate, frutas cítricas e feijão (BANSAL; KUMAR; PATIL, 2020; RYAN et al., 2011). As *Xanthomonas* spp. fitopatogênicas apresentam alta especificidade de plantas hospedeiras, sendo classificadas em patovares (RYAN et al., 2011). O cancro cítrico é uma doença causada pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) que atinge principalmente o gênero *Citrus* e é caracterizada pela presença de lesões circulares e marrons (Figura 1), que podem atingir todas as partes aéreas da planta e em árvores altamente infectadas pode causar queda de folhas e frutos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; JACQUES et al., 2016), causando grandes prejuízos econômicos. Na safra de laranjas 2020/21 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Sudoeste Mineiro houve perda de aproximadamente 21,60 % de frutos, sendo o cancro cítrico a quinta doença que mais afetou a safra, sendo responsável por 0,37% das perdas do período (FUNDECITRUS, 2021).



Figura 1- Frutos com lesões circulares e marrons características do cancro cítrico. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/canco>.

X. citri pode ser facilmente transmitida de uma planta para outra através do vento ou da água da chuva, dispersando assim a doença (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). A bactéria pode estar associada à superfície da planta de forma epifítica, não causando nenhum prejuízo para o desenvolvimento do hospedeiro, enquanto na colonização endofítica elas adentram a planta pelos estômatos ou feridas, se instalam e se multiplicam no xilema, causando a doença (AN et al., 2019; BÜTTNER; BONAS, 2010).

O genoma da linhagem *X. citri* 306 (estudada nesse trabalho) foi completamente sequenciado em 2002, a linhagem possui um cromossomo circular com 5,27 Mb e dois plasmídeos (pXAC64 e pXCC33) (RYAN et al., 2011; SILVA et al., 2002). Além disso, seu genoma possui um conteúdo G+C de 64,7% (SILVA et al., 2002).

1.2. Sistemas de secreção bacterianos

Os sistemas de secreção bacterianos são maquinarias proteicas que secretam complexos nucleoproteicos ou proteínas, desempenhando importante papel na virulência, adesão, adaptação e sobrevivência dos patógenos no ambiente e nas células hospedeiras. Esses sistemas de secreção podem translocar moléculas para o meio extracelular ou diretamente para o interior de uma célula alvo (COSTA et al., 2015).

Em bactérias já foram descritos nove tipos de sistemas de secreção, denominados I a IX. O sistema de secreção do tipo VI (SSVI) é uma maquinaria que transloca efetores para dentro da célula alvo (CIANFANELLI; MONLEZUN; COULTHURST, 2016; ZOUED et al., 2014), é amplamente distribuído no filo Proteobacteria e desempenha importante papel na morte de bactérias competidoras ou na virulência e resistência a predadores eucariontes (CIANFANELLI; MONLEZUN; COULTHURST, 2016). Os SSVI podem secretar diferentes efetores que são

classificados de acordo com a função que desempenham na célula alvo como: nucleases; enzimas formadoras de poros; fosfolipases; e enzimas que degradam a parede celular (DURAND et al., 2014).

O SSVI é composto por 13-14 proteínas, que formam uma estrutura que se assemelha à cauda do bacteriófago T4 de *E. coli* (CIANFANELLI et al., 2016; PUKATZKI et al., 2007) e são nomeados como *tss* (type six secretion genes). Além disto, existem genes acessórios que são denominados *tag* (type six accessory genes) e variam em número e função de acordo com o sistema da bactéria estudada (BOYER et al., 2009; SHALOM; SHAW; THOMAS, 2007).

Para que ocorra a formação do SSVI as proteínas TssJ, TssL e TssM se ancoram na membrana da bactéria formando o complexo de membrana (Figura 2). A placa de base formada pelas proteínas TssE, TssF, TssG e TssK é recrutada pelo complexo de membrana já formado, finalizando a formação da estrutura que é ancorada na membrana (BRUNET et al., 2015). Além disso, é necessário a formação de um tubo de hexâmeros da proteína Hcp (haemolysin coregulated protein), que é circundado pelas proteínas TssB e TssC, que se contraem e estendem, fazendo o sistema ejetar os efetores (BASLER et al., 2012). Para que as proteínas sejam ejetadas é necessário que no topo do tubo de Hcp tenha as proteínas VgrG (valine-glycine repeat protein G) e uma proteína com a repetição PAAR (proline-alanine-alanine-arginine), que também são essenciais para o funcionamento do SSVI (SHNEIDER et al., 2013).

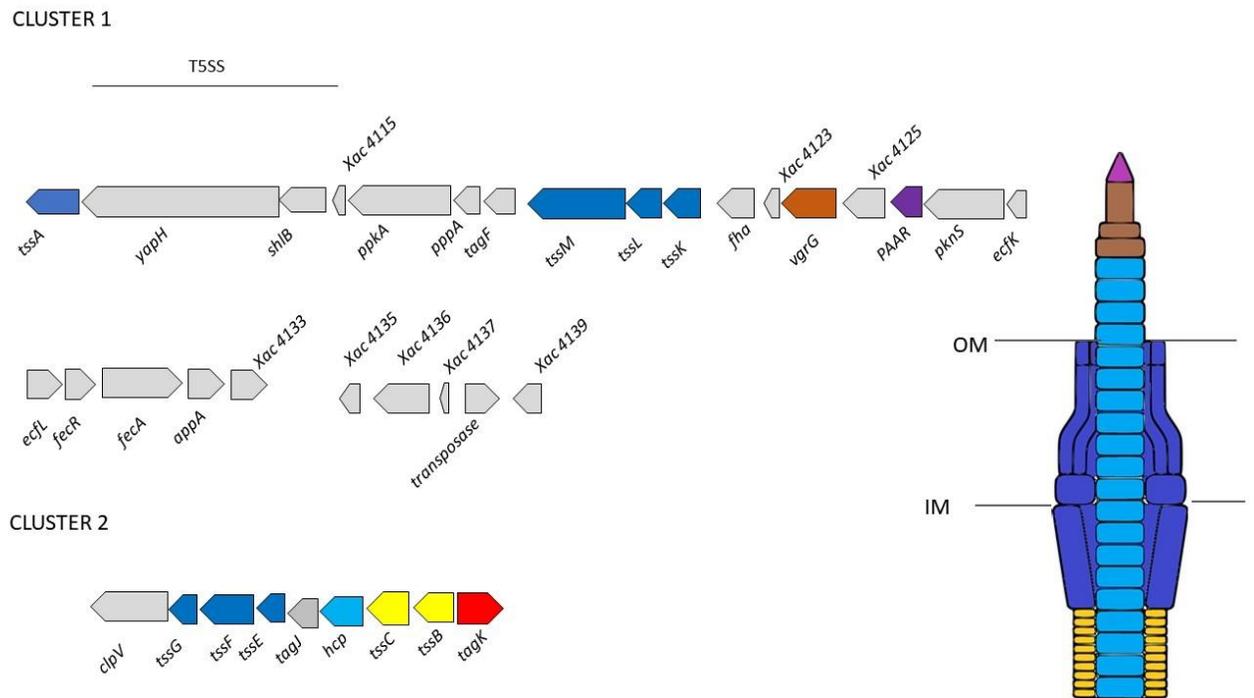


Figura 2-Esquema da organização gênica do SSVI de *X. citri*. Os genes que formam a estrutura básica do SSVI estão indicados em cores no esquema do cluster gênico, que correspondem às observadas no esquema da arquitetura do SSVI na membrana da bactéria, à direita da figura. Em vermelho destaque para o gene *tagK*, que codifica o fator de transcrição em estudo neste trabalho. Abreviações: (OM) Membrana externa (IM) Membrana interna. Elaborado com o auxílio do software Biorender.com.

Os grupamentos gênicos dos SSVI podem ser classificados em 5 clados em função da análise filogenética dos genes que codificam as proteínas estruturais e na presença de genes acessórios (*tag*) (BOYER et al., 2009). Em genomas de bactérias pertencentes a ordem Xanthomonadales são encontrados 3 dos 5 clados conhecidos (clado 1; clado 3, e clado 4) (Figura 3) (BOYER et al., 2009; BAYER-SANTOS et al., 2019).

Um único genoma *Stenotrophomonas sp* (LM91) possui SSVI do clado 1 (Figura 3), que é similar ao encontrado em *Vibrio cholerae* e possui um gene que codifica um fator sigma da família σ^{54} no grupamento gênico, além de um gene acessório denominado *tagO*, que não possui função conhecida (BAYER-SANTOS et al., 2019).

Como representantes que possuem SSVI do clado 4 temos *Xanthomonas oryzae* e *Lysobacter gummosus*. Os sistemas que se enquadram neste grupo podem ter duas arquiteturas principais (Figura 3), de acordo com a quantidade de duplicações do gene *vgrG* e a presença de genes com domínios de toxinas ou com funções ainda desconhecidas (BAYER-SANTOS et al.,

2019). Além disso, o cluster possui um gene *tagX* que codifica uma enzima que auxilia na degradação da parede celular bacteriana para montagem do SSVI (WEBER et al., 2016).

X. citri, modelo de estudo deste trabalho, assim como *Dyella japonica* e *Xanthomonas oryzae* possuem SSVI pertencentes ao clado 3. Neste clado, os genes que compõem o SSVI estão organizados em dois clusters, com uma região entre os dois grupamentos gênicos que podem variar de tamanho. A análise filogenética a partir do gene *tssC* demonstra a subdivisão do clado 3 em 3 subgrupos (3*; 3** e 3***) (BAYER-SANTOS et al., 2019). Os organismos que possuem SSVI do grupo 3 possuem em seu contexto genômico genes que regulam o sistema à nível pós traducional; nesse grupo a ativação do sistema ocorre quando uma serina/ treonina quinase (PpkA) fosforila a proteína Fha e o sistema é ativado; quando o sinal cessa, PppA desfosforila Fha e o sistema é desativado (MOUGOUS et al., 2007).

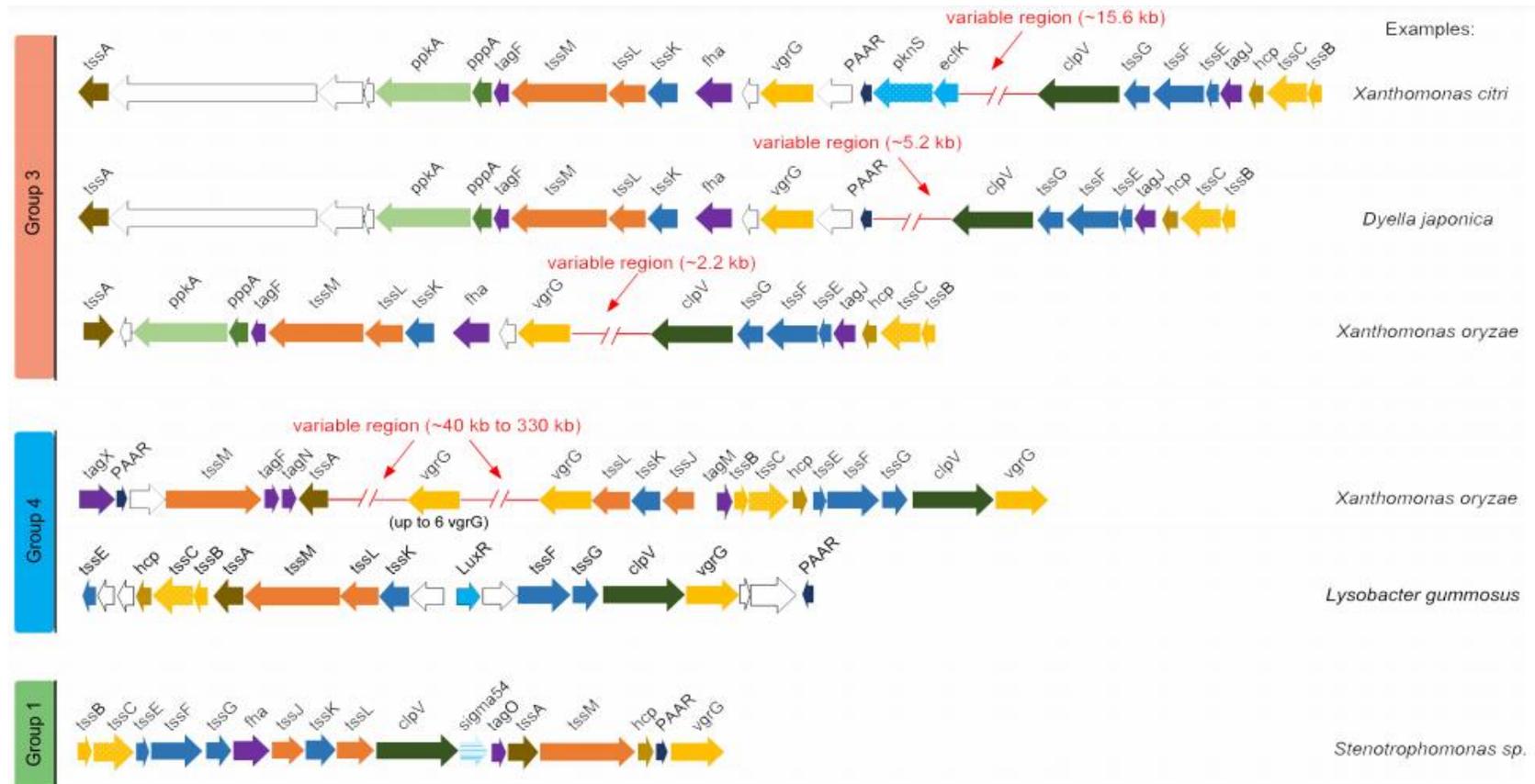


Figura 3- Organização dos SSVI da ordem Xanthomonadales. Representação esquemática da organização gênica dos SSVIs presentes na ordem Xanthomonadales, baseado na homologia do gene *tssC* (Retirado de BAYER-SANTOS et al., 2019).

No grupo 3*** estão grupamentos de SSVI que não codificam *pknS*, *ecfK* e *paar* e com uma região entre cluster de aproximadamente 2,2 kb. Já no grupo 3** estão SSVI que não possuem *pknS* e *ecfK* e que contém uma região de aproximadamente 5,2 kb separando os dois clusters (BAYER-SANTOS et al., 2019). *X. citri* possui um SSVI do tipo 3* organizado em dois grupamentos gênicos, separados por uma região de aproximadamente 15,6 kb (Figura 2). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que EcfK (*xac4128*), que codifica um fator sigma da RNA polimerase, é fosforilado por PknS (Lima, L. Dados não publicados) ativando assim o SSVI, necessário para a resistência de *X. citri* à predação pela ameba de solo *D. discoideum*.

Ainda são poucos os SSVI de Xanthomonadales com função conhecida descritos na literatura (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2021). O representante do clado 3* encontrado em *X. citri* foi o primeiro caracterizado e está envolvido na resistência à predação pela ameba *D. discoideum* (BAYER-SANTOS et al., 2018). No entanto, não está envolvido na formação de biofilme, adesão à superfície da folha, ou competição com leveduras ou bactérias (CESETI et al., 2019). Em *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* (*Xoc*), patógeno de arroz, o SSVI do clado 4 desempenha um importante papel na morte das bactérias alvo (ZHU et al., 2020). Já em *Xanthomonas phaseoli pv. manihotis* (*Xpm*), patógeno de mandioca, o SSVI está envolvido na virulência e motilidade (MONTENEGRO BENAVIDES et al., 2021).

1.3. Regulação gênica bacteriana

Uma das formas de controle de expressão de genes é o reconhecimento e ativação dos promotores gênicos e o início da transcrição pela RNA polimerase. A cerne da RNA polimerase é formada por cinco subunidades: duas subunidades alfa, α ; uma subunidade beta, β ; uma subunidade beta', β' ; e uma subunidade ômega, ω . Estas cinco subunidades são constantes e para que a enzima reconheça a região promotora dos genes que devem ser transcritos, é necessário a ligação do fator sigma (σ), formando a holoenzima (LEE; MINCHIN; BUSBY, 2012).

Os fatores sigma são subunidades dissociáveis da RNA polimerase que reconhecem de forma específica os promotores gênicos, promovendo o início da transcrição (BROWNING; BUSBY, 2004). Esses fatores sigmas são agrupados em duas famílias: σ^{70} e o σ^{54} (BALLEZA et al., 2009; BROWNING; BUSBY, 2016).

Um dos genes regulatórios presentes no grupamento gênico do SSVI de *X. citri* é *ecfK* (*xac4128*), que codifica um fator sigma da RNA polimerase. O EcfK de *X. citri* pertence à família σ^{70} e subfamília de sigmas alternativos ECF (Extracytoplasmic function σ factors), cujos membros se caracterizam pela presença dos domínios σ_2 e σ_4 , que são suficientes para a ligação do σ na RNA polimerase e para realizar o reconhecimento da região promotora (DE DIOS; SANTERO; REYES-RAMÍREZ, 2021; MASCHER, 2013). O *ecfK* presente no cluster do SSVI de *X. citri* é classificado no subgrupo ECF43, já que se caracteriza pela co-ocorrência com um gene que codifica uma serina/treonina quinase (*pknS*) (STARÓN et al., 2009). Em *Vibrio parahaemolyticus* foi descrito pela primeira vez a presença de um sigma ECF43 (EcfP) que é ativado por fosforilação, ou seja, na presença de um sinal a treonina quinase PknT fosforila o fator σ EcfP, e sua forma ativada aumenta a expressão de um *regulon* essencial para a resistência ao antibiótico polimixina (IYER et al., 2020).

O sigma EcfK de *X. citri* é essencial para a resistência à predação pela ameba de solo *Dictyostelium discoideum*. Além disso, ocorre aumento da expressão dos genes do SSVI de *X. citri* quando uma versão constitutivamente ativa do sigma EcfK (EcfK^{T51E}) é super expressa (BAYER-SANTOS et al., 2018). No entanto, apesar do aumento significativo na expressão dos genes do SSVI, não foi possível observar aumento na quantidade de proteínas (dados não publicados). Em estudos anteriores do nosso grupo, foi possível identificar o *regulon* do sigma EcfK, pela análise dos genes diferencialmente expressos na linhagem superexpressando a versão constitutivamente ativa deste regulador (EcfK^{T51E}), em comparação a linhagem selvagem. Nesta análise, foram identificados majoritariamente genes que expressam componentes estruturais do SSVI de *X. citri* (80%), além de genes que codificam oxido redutases, chaperonas e um fator de transcrição ainda não caracterizado, TagK (*xac4148*), que é o alvo de estudo deste trabalho (Figura 2) (LIMA, 2017).

Os fatores de transcrição (FTs) são proteínas que regulam de forma positiva (ativador) ou negativa (reprimindo) um ou diversos promotores (BROWNING; BUSBY, 2016). O estilo de vida, assim como o tamanho do genoma bacteriano são importantes indicadores para a abundância dos FTs. As bactérias patogênicas ou de vida livre possuem uma maior abundância de FTs comparadas aquelas intracelulares obrigatórias, já que vivem em ambientes com mudanças constantes, como alteração de pH e temperatura, por exemplo (PEREZ-RUEDA et al., 2018; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, 2015).

Os FTs atuam de diferentes formas nos promotores gênicos, como ativadores, repressores ou ambos. Os ativadores podem ser de três tipos: aqueles que se ligam a montante da região -35 dos promotores e são denominados ativadores de classe I; aqueles que se ligam na sobreposição da região -35, denominados ativadores de classe II e aqueles que alteram a conformação das posições -35 e -10 favorecendo a ligação da RNA polimerase (BROWNING; BUSBY, 2004)

Já os FTs que atuam como repressores também podem ser de três tipos: aqueles que se ligam próximos ou na região -35 e -10 impedindo que a RNA polimerase se ligue ao promotor; os que se ligam ao promotor causando uma modificação conformacional (looping) que impede a ligação da RNA polimerase; e os que atuam como antiativadores (BROWNING; BUSBY, 2004).

FTs podem ser classificados em famílias, de acordo com a presença de dois tipos de domínios conservados:

- Domínio sensor: pode desempenhar diversas funções dentre elas: sítio de ligação a um indutor, geralmente uma proteína ou metabólito, como consequência de alguma modificação ambiental ou fisiológica da célula bacteriana (BALLEZA et al., 2009; PEREZ-RUEDA et al., 2018).
- Domínio de ligação ao DNA: normalmente localizado na porção C-terminal ou N-terminal da proteína e que se liga à região regulatória dos genes (BALLEZA et al., 2009; PEREZ-RUEDA et al., 2018).

1.4. Fatores de transcrição da família AraC/ XylS

Um dos genes regulatórios presentes próximos ao cluster do SSVI de *X. citri* é o fator de transcrição codificado por *xac4148* (*tagK*: type 6 associated gene K), alvo de estudo deste trabalho e que possui um domínio característico da família AraC/ XylS. Membros desta família são responsáveis por regular processos como resposta a estresse, metabolismo de carbono, patogênese, entre outros (GALLEGOS et al., 1997; PEREZ-RUEDA et al., 2018).

A família possui como característica a presença de um domínio de ligação ao DNA (C-terminal) com aproximadamente 99 aminoácidos, que contém dois domínios HTH (Helix-Turn-Helix) e um domínio sensor (N-terminal) que é bastante variável em extensão (GALLEGOS et al., 1997; PEREZ-RUEDA et al., 2018). Os FTs pertencentes a esta família podem ser divididos em:

FTs que possuem domínio sensor e domínio de ligação ao DNA no mesmo polipeptídeo e aqueles que precisam ser ativados por outros reguladores (GALLEGOS et al., 1997).

Um dos FT da família AraC/ XylS mais bem descritos na literatura é o AraC de *E. coli*. Esse FT possui no mesmo polipeptídeo o domínio sensor e o domínio de ligação ao DNA e é responsável por regular a expressão de quatro genes: *araA*; *araB*; *araC* e *araD*, que codificam três enzimas necessárias para que a arabinose seja convertida em D- xilulose 5 fosfato, gerando substrato para a via das pentoses fosfato (SCHLEIF, 2000). Na ausência de arabinose, AraC atua negativamente, enquanto na presença de arabinose atua positivamente, além de autoregular sua expressão em função da presença ou ausência do açúcar (SCHLEIF, 2000). Na ausência de arabinose, este fator de transcrição forma dímeros, a região N- terminal da proteína interage com o DNA, se ligando aos locais I₁ e O₂, que estão distantes 210 pb, formando uma curvatura no DNA e impedindo a ligação da RNA polimerase (SCHLEIF, 2003, 2010). Quando a arabinose está presente, as regiões N- terminal se ligam ao açúcar e a região de ligação ao DNA fica livre para interagir com os locais I₁ e I₂, favorecendo a ligação da RNA polimerase para a transcrição do operon (SCHLEIF, 2003, 2010). Assim como AraC de *E. coli*, os demais membros da família ativados por açúcares são ativos como dímeros e ativam promotores de classe II (MARTIN; ROSNER, 2001).

FTs como MarA (Multiple antibiotic resistance A gene), Rob (Right-origin-binding gene) e SoxS (Superoxide S gene) de *E. coli*, que são homólogos de AraC e pertencem a família AraC/ XylS, são responsáveis por regular um grande conjunto de genes (KWON et al., 2000) que respondem a estímulos como: alteração de pH, estresse oxidativo e presença de antibióticos. Os três FTs regulam um conjunto comum de promotores, atuando, por exemplo, no efluxo de drogas, regulando positivamente um RNA pequeno (MicF) que diminui a presença de porinas (OmpF), além de regular positivamente a bomba de efluxo de drogas AcrAB- TolC (COHEN; MCMURRY; LEVY, 1988; DUVAL; M, 2013; OKUSU; MA, 1996).

O gene que codifica o FT MarA está presente no operon *marRAB*. MarA atua como regulador positivo, enquanto MarR tem papel de repressor. Na presença de salicilato, MarR se liga a essa molécula, diminuindo a repressão no promotor *marRAB*, sendo assim possível a transcrição de MarA (JAIN; SAINI, 2016). Além de ser regulado por MarR, MarA ainda é autorregulado positivamente, se ligando à região -35 do operon *marRAB* (DUVAL; M, 2013). Uma pequena

proteína Fis (Factor for inversion stimulation) auxilia na regulação do operon *marRAB* quando MarA, Rob ou SoxS estão presentes (DUVAL; M, 2013).

SoxR é um autorrepressor da família MerR que sofre oxidação em presença de superóxidos e ativa a transcrição de *soxS* (GAUDU; MOON; WEISS, 1997; JAIN; SAINI, 2016). SoxS é capaz de reprimir sua transcrição e, apesar das semelhanças entre os *regulons* de MarA e SoxS, SoxS responde mais rapidamente a estresses oxidativos e MarA a antibióticos (DUVAL; M, 2013).

Já o regulador Rob é expresso de forma constitutiva e possui um domínio na porção C-terminal que se liga a indutores como biperidina, um tipo de quelante que forma complexos com o ferro (ROSNER et al., 2002). Além disto, o domínio na região C-terminal também impede que Rob seja degradado pela protease Lon, que degrada MarA e SoxS (DUVAL; M, 2013; KWON et al., 2000; GRIFFITH; SHAH; WOLF, 2004; JAIN; SAINI, 2016). MarA e Rob são FT que atuam como monômeros e ativam promotores de classe I e classe II (MARTIN; ROSNER, 2001).

No genoma de *X. citri* encontram-se preditos 15 FTs pertencentes a família AraC/ XylS (*xac0253*, *xac0355*, *xac0536*, *xac0581*, *xac0727*, *xac1207*, *xac1266*, *xac1442*, *xac2166*, *xac2235*, *xac2551*, *xac2839*, *xac3026*, *xac3445*, *xac4148*). HrpX (codificado por *xac1266*) é o único FT pertencente à família já caracterizado e está envolvido na ativação do SSIII (FIGUEIREDO et al., 2011; KOEBNIK et al., 2006). Para que o SSIII seja ativado é necessário que HrpG seja fosforilado por uma quinase ainda não conhecida e ative a transcrição de *hrpX* e *hrpA* (FIGUEIREDO et al., 2011; TEPER; PANDEY; WANG, 2021). O *regulon* de *hrpX* possui 181 genes (GUO et al., 2011) e a deleção de *hrpX* faz com que as bactérias sejam incapazes de colonizar e causar doença nos hospedeiros, além de diminuir a transcrição de genes do SSIII (BÜTTNER; BONAS, 2010; TEPER; PANDEY; WANG, 2021).

Os mecanismos envolvidos na regulação e ativação do SSVI de *X. citri* ainda não são bem caracterizados. Portanto, encontrar genes acessórios, como por exemplo *tagK*, que podem elucidar como o sistema é regulado, é de suma importância no desenvolvimento de estratégias para controlar a sobrevivência desse fitopatógeno no ambiente. Além disso, os mecanismos elucidados nesse trabalho podem ser aplicados em outros patógenos que possuem mecanismos de ação semelhantes.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é caracterizar a função do fator de transcrição TagK na expressão dos genes do SSVI de *X. citri*, além de determinar seu *regulon*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise Filogenética

Para a análise de similaridade as proteínas com identidade à TagK superior ou igual a 40% foram selecionadas, utilizando o banco de dados KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000), disponível no endereço eletrônico (<https://www.genome.jp/kegg/>), as sequências das proteínas foram alinhadas utilizando o programa MEGA- X, com a ferramenta MUSCLE.

A filogenia foi construída utilizando o método Neighbor- Joining (SAITOU; NEI, 1987), o método estatístico Bootstrap foi utilizado com 500 réplicas para validação da robustez dos dados gerados. O contexto genômico dos homólogos de *tagK* foi analisado, verificando-se a presença de genes codificando homólogos de EcfK, PknS e componentes estruturais do SSVI.

3.2. Linhagens e meios de cultivo

Neste trabalho utilizamos as linhagens descritas na Tabela 1. As linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli*) foram utilizadas para obter e selecionar construções de interesse que, uma vez confirmadas, foram transferidas para *X. citri* para avaliar a função do gene estudado.

Tabela 1- Linhagens utilizadas neste trabalho

Espécie	Linhagem	Característica	Referência
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44 lacU169 (80 lacZ M15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 realA1</i>	(HANAHAN, 1983).
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	<i>X. citri</i> 306	Linhagem WT, cepa 306, subgrupo A, Ap ^R	(SILVA et al., 2002)
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	$\Delta tagK$	Linhagem derivada da cepa 306, com deleção em fase do <i>tagK</i> _{xac4148} .	Este estudo
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	$\Delta ecfK$	Linhagem derivada da cepa 306, com deleção em fase do <i>ecfK</i> _{xac4128} .	(BAYER-SANTOS et al., 2018)
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	WT:: <i>paar</i> -HA	Linhagem derivada da cepa 306, com a cópia selvagem do gene <i>paar</i> _{xac4126} substituída por <i>paar</i> -HA.	Lucas Ceseti (não publicado)
<i>Dictyostelium. Discoideum</i> AX2	<i>D. discoideum</i> AX2	Isolado axênico de AX1	(WATTS; ASHWORTH, 1970)

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5) suplementado com os seguintes antibióticos: canamicina (50 μ g/mL), estreptomicina (100 μ g/mL), de acordo com o plasmídeo utilizado.

As linhagens de *X. citri* foram cultivadas a 28°C em LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL), ou antibióticos de seleção de acordo com os plasmídeos transformados. Quando necessário, 15 g/L de ágar foi adicionado aos meios para o crescimento das linhagens em meio sólido.

3.3. Construção dos vetores

Para construção da versão truncada do gene *tagK*, as regiões que flanqueiam o gene foram amplificadas independentemente e fusionadas por PCR de sobreposição. Na construção foram mantidas apenas pequenas regiões das extremidades 5' e 3' do gene em cada um dos fragmentos, denominados F1 e F2, que foram fusionadas mantendo-se a matriz de leitura. Em seguida, os fragmentos F1 e F2 foram utilizados como molde para uma nova reação de amplificação, a fim de obter um fragmento contendo a sequência gênica truncada, conforme demonstrado na Figura 4.

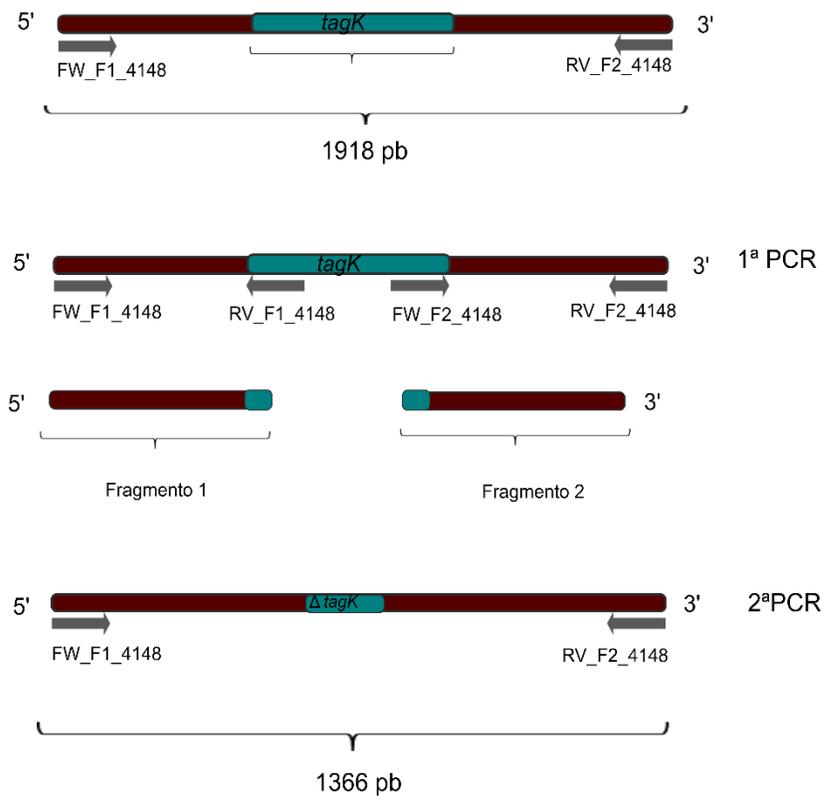


Figura 4- Estratégia para obtenção da construção de deleção de *tagK*- Em verde a representação esquemática do gene e em vermelho a região a montante e jusante do gene de interesse. As setas indicam os oligonucleotídeos utilizados em cada uma das etapas de recombinação.

O fragmento amplificado foi então digerido com as enzimas de restrição EcoRI e Hind III e ligado ao plasmídeo pNPTS138 (M R K ALLEY, dados não publicados), que possui como características a incapacidade de se replicar em *X. citri*, resistência a canamicina e possui o gene *sacB*, que confere sensibilidade à presença de sacarose no meio de cultura.

Para a complementação e super expressão dos genes de interesse em *X. citri* o plasmídeo pBRA, derivado do vetor pBAD24, foi utilizado (GUZMAN et al., 1995). Neste vetor, os genes de interesse são clonados a jusante de um promotor induzido por arabinose (MARROQUIM M; ANDRADE M; FARAH CS, dados não publicados). Além disto, o plasmídeo confere resistência ao antibiótico estreptomicina e possui origem de replicação de amplo espectro de hospedeiros. O gene *tagK* foi amplificado com os oligonucleotídeos XAC 4148_FW_com e XAC 4148_RV_com, digerido com as enzimas NcoI e SalI e ligado ao vetor, as reações foram transformadas em *E. coli*. As colônias resistentes à estreptomicina foram confirmadas por PCR

com os oligonucleotídeos pXACFor e XAC 4148_RV_com para a presença do inserto de interesse. Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.

As construções confirmadas foram extraídas pelo kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), seguindo as orientações do fabricante, e o inserto clonado foi sequenciado utilizando o kit Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing na Central Analítica IQ/USP. Após o sequenciamento e a confirmação das construções, os plasmídeos foram transferidos para *X. citri* por transformação.

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2.

Tabela 2- Vetores e construções

Vetor/Construção	Característica	Referência
pBRA	Vetor induzível por arabinose, derivado do pBAD24 (Guzman et al., 1995)	(MARROQUIM M; ANDRADE M; FARAH CS, dados não publicados)
pNPTS138	Replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	(M R K ALLEY, dados não publicados)
pNPTS138 <i>tagK</i>	Vetor pNPTS138 com a inserção de deleção do gene <i>tagK</i> ₄₁₄₈	Este estudo
pBRA <i>tagK</i>	Vetor pBRA com a inserção do gene <i>tagK</i> _{sac4148}	Este estudo
pBRA <i>ecfK</i> T51E	Vetor pBRA com a inserção do gene <i>ecfK</i> T51E	(LIMA, 2017; (BAYER-SANTOS et al., 2018)

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Nome	Sequence (3'-5')	Descrição
FW_F1_4148	ATAAAGCTTCTTTCTGAAGGTGATATCC	Primer forward com sítio de enzima de restrição HindIII usado para deleção em fase do gene <i>tagK</i>
RV_F1_4148	CTCCGGTTGTGCATGACTGCTGCTGCTCAT	Primer reverso com região de sobreposição utilizado para a deleção em fase do gene <i>tagK</i>

Fw_F2_4148	GCA CAA CCG GAG CCG ATG	Primer forward com região de sobreposição utilizado para a deleção em fase do gene <i>tagK</i>
RV_F2_4148	TATGAATTCCTGCAAGATTGATCCAT	Primer reverso com sítio de enzima de restrição EcoRI usado para deleção em fase do gene <i>tagK</i>
XAC 148_FW_Com	ATACCATGGGATTGGCGCTGCTTTTCTCG	Primer forward com sítio de enzima de restrição NcoI usado para a complementação da deleção do $\Delta tagK$
XAC 4148_RV_Com	TATGTCGACTCAAAGTGCTTCGCTCTC	Primer reverso com sítio de enzima de restrição Sall usado para a complementação da deleção do $\Delta tagK$
4148RT_FW	CAGCAAGCGTTCGCGTTAT	<i>tagK_{xac4148}</i> /RT-PCRq
4148RT_RV	GCCTCCACGCGACTGAAA	<i>tagK_{xac4148}</i> /RT-PCRq
RpoB For	GGA TTC CTA TCG CGA ATT CCT	<i>RpoB</i> /RT-PCRq
RpoB Rev	TGT AGC TGG AAA TCG GGA ACA	<i>RpoB</i> /RT-PCRq
4128QRTFOR	AGG TGG ACG AGC GCA AAG	<i>ecfK_{xac4128}</i> /RT-PCRq
4128QRTREV	ACC GAC ACC TCC AGC TGT TC	<i>ecfK_{xac4128}</i> /RT-PCRq
4124QRTFOR	ACG CCA AGC AGC GCA CCT ACT	<i>vgrG_{xac4124}</i> /RT-PCRq
4124QRTREV	AGA TGC CTT CGC GTT CCA	<i>vgrG_{xac4124}</i> /RT-PCRq
4140QRTFOR	ATC CGC GAG CCG TTG TT	<i>clpV_{xac4140}</i> /RT-PCRq
4140QRTREV	GAG CGG GTA ATA CGG AAT CG	<i>clpV_{xac4140}</i> /RT-PCRq
4147QRTFOR	GTG GAT ATC ACC TTC GAA AGC AT	<i>tssB_{xac4147}</i> /RT-PCRq
4147QRTREV	GCG CTT CCA GCA ATT TGG	<i>tssB_{xac4147}</i> /RT-PCRq
P4147-FOR	ATA GAA TTC AAC GCT TGC TGC AAC GA	Primer forward do promotor <i>xac4147</i>

		utilizado para confirmação das amostras tratadas com DNaseI
P4147-REV	ATA AAG CTT ATG AAC TTC TGA CTG CT	Primer reverso do promotor <i>xac4147</i> utilizado para confirmação das amostras tratadas com DNaseI
pXACFor	CTGTTTCTCCATACCCGTT	Confirmação da linhagem de superexpressão

3.4. Transformação de *E. coli* e *X. citri*

Os plasmídeos de interesse foram transferidos para *E. coli* por transformação, realizadas utilizando células termocompetentes. Células (50 μ L) foram incubadas por 30 minutos no gelo com o plasmídeo de interesse e em seguida em banho maria a 42 °C por 45 segundos e imediatamente transferidas para o gelo por 1 minuto. As células foram recuperadas por incubação de 1 hora em 1 mL de meio SOC (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 2,5 mM; 0,35% de glicose) e cultivadas em meio LB contendo o antibiótico de seleção para cada um dos plasmídeos usados.

Para o preparo das células competentes de *X. citri*, a cepa WT foi cultivada em 50 mL de meio Circle Growth (MP Biomedicals) por 16 h (180 rpm a 28°C), ou até chegarem a uma DO₆₀₀ 0,5. As células foram coletadas por centrifugação e lavadas por 3 vezes com 50, 25 e 15 mL de água destilada e estéril. As células competentes foram coletadas por centrifugação e alíquotas de 50 μ L foram utilizadas para a eletroporação, usando cubetas de 0,2 cm e os parâmetros 2 kV, 25 μ F e 200 Ω , com um volume máximo de DNA de 10% do volume de células. As células foram recuperadas por cultivo em meio 2xTY (triptona 16 g/L; extrato de levedura 10 g/L; NaCl 5g/L; pH 7,4) por 3 horas e material semeado por espalhamento em meio LB contendo canamicina (50 μ g/mL).

3.5 Obtenção de Linhagem Mutante de *X. citri*

A linhagem mutante de interesse foi obtida por substituição da cópia selvagem do genoma pela versão truncada previamente clonada no vetor suicida pNPTS138, ou seja, incapaz de

se replicar em *X. citri*, através de dois eventos de recombinação homóloga (Figura 5). No primeiro evento de recombinação o plasmídeo foi inserido no genoma, o que conferiu às células recombinantes resistência a canamicina e sensibilidade a sacarose. As colônias com estas características foram confirmadas por PCR de colônia e possuíam em seu genoma a cópia selvagem e mutante do gene de interesse. As colônias confirmadas foram cultivadas em LB líquido por 24 horas a 28°C e células que sofreram o segundo evento de recombinação, perdendo o vetor pNPTS138, foram selecionadas em meio LB contendo sacarose 5%. Colônias assim obtidas foram testadas quanto à sensibilidade à canamicina. (RIED; COLLMER, 1987). O segundo evento, assim como o primeiro, foi confirmado por PCR de colônia. No entanto, nesta etapa as linhagens de interesse deveriam ter em seu genoma apenas a cópia mutante do gene de interesse.

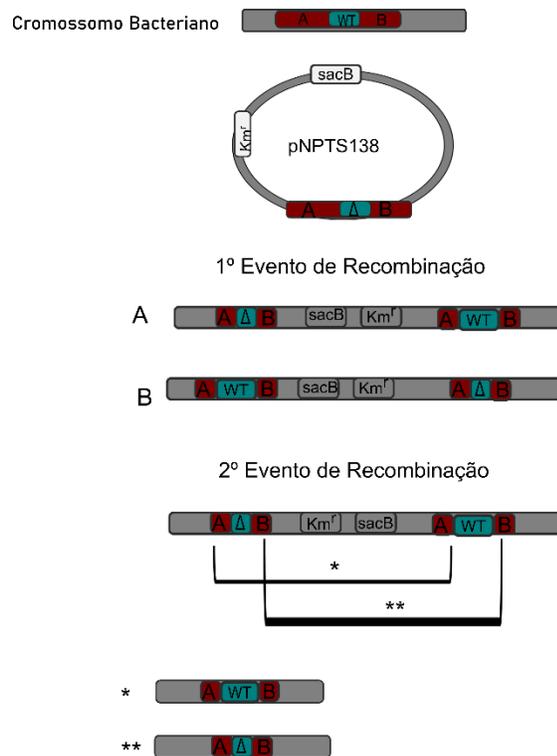


Figura 5- Representação esquemática dos dois eventos de recombinação homóloga necessários para obtenção da linhagem mutante com deleção em fase de *tagK*. Primeiro evento de recombinação, também chamado intermolecular: este evento de recombinação gera linhagens contendo duas cópias do gene (WT e Δ). Segundo evento de recombinação, também denominado de recombinação intramolecular: a linhagem resultante sofreu a perda do plasmídeo e possui apenas uma das cópias do gene (WT ou Δ). Adaptado de GAO et al., 2006. * Indica a obtenção da linhagem que possui a cópia selvagem; ** Indica a obtenção da linhagem que possui a cópia deletada.

3.6. Extração de RNA de culturas de *X. citri*

As culturas saturadas de *X. citri* pré-incubadas por 18 h a 28°C, foram diluídas para DO₆₀₀ 0,1 em um volume final de 25 mL de LB contendo estreptomicina. As culturas foram incubadas (180 rpm a 28°C) por aproximadamente 5 horas, ou até atingirem a DO_{600nm} 0,5. Em seguida, amostras de 2 mL de cada cultura foram submetidas à centrifugação por 1 minuto a 16.000 x g.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 500 μ L de Trizol Reagent (Ambion). Estas amostras correspondentes ao ponto 0 hora foram armazenadas

a -80°C até o momento da extração do RNA. Após a coleta do ponto 0 hora, arabinose em uma concentração final de 0,3% foi adicionada ao volume restante de cultura (23 mL). Após 30 minutos de indução com arabinose foi coletada uma nova amostra de 2 mL e o protocolo descrito acima foi realizado.

Amostras em Trizol Reagent (Ambion) foram incubadas por 10 minutos a 65°C . Em seguida, 100 μL de clorofórmio foi adicionado e a mistura foi gentilmente homogeneizada, por aproximadamente 15 segundos, seguindo-se de incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram então submetidas a centrifugação a $20.817 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Após a etapa de centrifugação, a solução resultante foi separada em três fases, uma inferior vermelha de fenol clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase superior incolor. A fase superior contendo RNA foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 mL. O RNA foi precipitado pela adição de 250 μL de isopropanol e as amostras foram incubadas por 16 h a -80°C .

Após a incubação, as amostras foram submetidas a centrifugação $20.817 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo o RNA foi lavado com 500 μL de etanol 75%, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação a $20.817 \times g$ por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi seco a temperatura ambiente por 10-15 minutos. Em seguida, o RNA foi suspenso em H_2O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado por 10 minutos a 60°C .

3.7. Síntese de cDNA e ensaio de qRT- PCR

O RNA obtido conforme descrito no item 3.5 foi quantificado em espectrofotômetro Epoch-Biotek e 3 μg de cada amostra foi tratado com DNase I (Thermo Scientific), por 30 minutos a 37°C . Após o tratamento, a ausência de DNA residual foi verificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos P4147-FOR e P4147-REV para o promotor do gene *xac4147* (Tabela 2) e posterior análise em gel de agarose. Após a confirmação por PCR da ausência de DNA genômico contaminante, as amostras foram inativadas com EDTA na concentração final de 5 mM e 500 ng de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA com o kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), conforme orientação do fabricante. 30 ng de cDNA e 0,4 μM de

oligonucleotídeos foram utilizados para a reação de qRT-PCR com o kit SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) no equipamento Fast Real Time PCR System 7500 (Biosystem).

O seguinte ciclo foi utilizado: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos, 63°C por 1 minuto (estas duas últimas etapas foram repetidas 40 x), 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95° por 15 segundos e 60°C por 15 segundos. O gene *rpoC* foi utilizado como normalizador e a expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A eficiência dos oligonucleotídeos foi calculada utilizando curva padrão, somente aqueles com $R^2 > 0,98$ e eficiência entre 90% - 105% foram utilizados.

3.8. Obtenção de Extratos Proteicos Totais e Imunoblot

Para a extração de proteínas totais, as linhagens foram cultivadas por 16 horas (180 rpm a 28°C) em LB, com adição de estreptomicina (50 µg/mL). No dia seguinte, todas as culturas foram diluídas para OD_{600nm} 0,1 em um volume final de 25 mL de LB acrescido de estreptomicina (50 µg/mL) e arabinose na concentração final de 0,3%. As culturas foram incubadas (180 rpm a 28°C) por aproximadamente 5 horas, ou até atingirem a DO_{600nm} 0,5. Em seguida, alíquotas de 2 mL foram coletadas e submetidas à centrifugação por 2 minutos a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lisado pela adição de tampão SDS-PAGE 1x (glicerol 50%; Tris-HCl 260 mM pH 6,8; SDS 10%; azul de bromofenol 0,5%; β-mercaptoetanol 715 mM). O volume de tampão foi corrigido pelo número estimado de células, de acordo com a DO_{600nm}, utilizando-se 50 µL de tampão por mL de cultura em DO_{600nm} 0,5.

Géis de poliacrilamida (SDS- PAGE) 10% ou 15% foram utilizados de acordo com o tamanho da proteína analisada. Após a polimerização do gel, as amostras foram fervidas por 5 minutos a 95°C e 20 µL de amostra foram aplicadas. O marcador de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad). O gel foi submetido a eletroforese por 100 V por 3 horas em tampão de corrida (glicina 14,5 g/L; Tris- base 3 g/L; SDS 1 g/L). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham) pelo método semisseco sob corrente elétrica 108 mA por 1 hora. A membrana e papéis filtro utilizados foram pré-incubados por 15 minutos no tampão de transferência (Tris- base 5,81 g/L; glicina 2,98 g/L; SDS 0,375%, metanol, 20% pH 9,2).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 1% de leite em pó dissolvido em tampão TBS-T (Tris- base 20 mM pH 7,5; NaCl 50 mM e Tween 20 0,1%) por pelo menos 2 horas a 25°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com PBS (Tris-base 20 mM pH 7,5; NaCl 50 mM) por três vezes de 5 minutos e uma vez com o tampão TBS-T por 10 minutos. Para a revelação, a membrana foi incubada por 18 horas com anticorpo primário anti- HA (Abcam ab9110) diluído 1:1000, ou 4 horas para o anticorpo primário anti- HCP (produzido a partir de peptídeo sintético pela empresa Rhea Biotech) diluído 1:1000. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada com TBS e TBS-T, como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti- Rabbit IgG (Thermo Fischer) diluído 1:30.000, por 1 hora. A detecção foi feita com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent (GE Healthcare).

3.9. Ensaio de formação de placa de fagocitose

Os ensaios de placa de fagocitose foram realizados conforme descrito por FROQUET et al., 2009. As bactérias foram cultivadas em 2 mL de meio LB com adição de antibiótico e incubadas por 16 horas a 28°C. A cultura bacteriana foi submetida a centrifugação 4.700 x g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em 1 mL de LB líquido. A DO_{600nm} das culturas foi ajustada para 4.

As culturas foram então diluídas 1:100 e alíquotas de 50 µL foram adicionadas em placas de 24 poços, contendo 2 mL de SM-ágar (glicose 10 g/L; peptona 10 g/L, extrato de levedura 1 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L; KH_2PO_4 , 1,9 g/L pH 6,0-6,4 e ágar 20 g/L). As placas foram homogeneizadas e permaneceram no fluxo por 1 hora ou até que estivessem totalmente secas.

No preparo da cultura de *D. discoideum* (AX2) foram utilizadas amostras cultivadas por aproximadamente 48 horas em meio HL5 (peptona 14,3 g/L; extrato de levedura 7,15 g/L; maltose monohidratada 18 g/L; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,641 g/L e KH_2PO_4 0,49 g/L). As amebas foram coletadas das placas de 90 mm por pipetagem e transferidas para microtubos. Alíquotas de 10 µL foram coletadas para contagem em câmara de Neubauer. As células foram coletadas por centrifugação a 400 x g por 5 minutos e suspensas em uma concentração final de 1.000 amebas /µL e diluições seriadas 1:2 em meio HL5 foram preparadas. Alíquotas de 5 µL de cada diluição de *D. discoideum* foram colocadas no centro de cada poço contendo as culturas secas de bactérias

e as placas foram deixadas secando por 5 minutos. As placas foram incubadas por 7 dias a 22°C, o halo de fagocitose começou a ser observado após 3 dias de incubação, ficando mais evidente no 5º dia.

3.10. Extração de RNA de *X. citri* em contato com *D. discoideum*

Para a extração de RNA foi necessário cultivar as bactérias por 16 horas (180 rpm a 28°C) em LB com adição de estreptomicina (50 µg/mL). No dia seguinte, as culturas foram submetidas à centrifugação (8.000 rpm por 1 minuto), o sobrenadante foi descartado e as bactérias suspensas em 1 mL de DB (KH₂PO₄ 5 mM; Na₂HPO₄ 5 mM; CaCl₂ 1 mM e MgCl₂ 2 mM), sendo ajustadas as culturas para a DO_{600nm} 5,0. Para o preparo da cultura de *D. discoideum* (AX2) foram utilizadas placas com aproximadamente 48 horas de cultivo em HL5. As amebas foram coletadas das placas de 90 mm e transferidas para um tubo. Em seguida, alíquotas de 10 µL foram coletadas para contagem em câmara de Neubauer. O restante da cultura foi centrifugado 1.500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células de *D. discoideum* foram suspensas em DB. Após a lavagem, volume contendo 1,5 x 10⁶ células foram transferidas para tubos de 1,5 ml, as culturas foram centrifugadas 500 x g por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 50 µL das culturas de bactérias normalizadas. A mistura foi transferida para placas de 24 poços, que permaneceram no fluxo por 1 hora, sendo então coletado o ponto considerado 0 h da análise. Para isso, as células foram coletadas pela adição de 1 mL de DB em cada poço e o material foi submetido a centrifugação por 400 x g por 1 minuto para remoção do excesso de bactérias não associadas a *D. discoideum* (sobrenadante), e o pellet foi suspenso em 1 mL de Trizol. Após a coleta do ponto 0 hora, as placas foram incubadas por 24 horas a 22°C. Em seguida, as amostras foram coletadas conforme descrito acima. A extração de RNA e análise por qRT-PCR foram realizadas conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6.

3.11. Preparo de biblioteca de cDNA e Transcritoma

Amostras de RNA total foram extraídas das linhagens de interesse WT pBRA; WT pBRA *tagK* e Δ *ecfK* pBRA *tagK*. Para isso, as linhagens foram incubadas por 16 h (180 rpm a 28°C) em LB. As culturas saturadas foram diluídas para DO_{600nm} 0,1 em um volume final de 25

mL de LB acrescido de estreptomicina. As culturas foram incubadas por aproximadamente 5 horas sob agitação (180 rpm a 28°C), ou até chegar a DO_{600nm} 0,5. Amostras de 6 mL de cultura foram submetidas à centrifugação por 1 min a 16.000 x g para coleta das células. A lise celular foi realizada pela adição de 1 mL de Trizol Reagent (Ambion) e incubação por 10 minutos a 65°C. Em seguida, 100 µL de clorofórmio foi adicionado e a mistura foi gentilmente homogeneizada invertendo-se o tubo por aproximadamente 15 segundos, seguindo-se de incubação a temperatura ambiente por 5 minutos.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 20.817 x g por 15 minutos a 4°C, levando a separação em três fases: uma inferior vermelha de fenol clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase superior incolor. A fase superior foi coletada e transferida para o filtro do kit de purificação de RNA da RiboPure (Ambion®/Life Technologies) e as etapas seguintes de purificação de RNA foram realizadas conforme instruções do fabricante. O RNA foi quantificado com espectrofotômetro Epoch-Biotek (absorbância de 260 nm) e 10 µg de RNA total foi tratado com TURBO DNA-free™ kit (Ambion®/Life Technologies), conforme descrito no manual do fabricante.

A integridade do RNA total livre de DNA foi verificada utilizando o 2100 Bioanalyzer usando o Prokaryote Total RNA Nano (Agilent Technologies) disponível no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho de Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Amostras de 5 µg de RNA foram utilizadas para a remoção do RNA ribossomal utilizando o kit RiboZero® rRNA removal (Illumina), seguindo as orientações do fabricante.

Após a depleção do RNA ribossomal, as bibliotecas de cDNA foram geradas utilizando o kit Truseq Stranded mRNA (Illumina). A validação das bibliotecas foi feita pelo 2100 Bioanalyzer usando o Agilent DNA 1000 kit (Agilent Technologies), na facility LaCTAD e quantificadas pelo KAPA Library Quantification Kit Illumina platforms (KAPA Biosystems). Nesta análise foi avaliada a qualidade e quantidade de fragmentos de cDNA gerados. As bibliotecas quantificadas foram normalizadas para 4 nM e a corrida foi realizada no equipamento NextSeq com uso do NextSeq 500/550 Mid Output v2 kit (150 cycles, 2x75) pela facility GENIAL/CEFAP do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os dados foram analisados em parceria com a Profa. Dra. Tie Koide e do Dr. Alan Lorenzetti, ambos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

4. RESULTADOS

4.1. Análise do fator de transcrição TagK

O fator de transcrição TagK possui 223 aminoácidos, um domínio de fator de transcrição da família AraC/ XylS (resíduos 48-146) e dois domínios de ligação ao DNA do tipo HTH. Na Figura 6 podemos observar o alinhamento dos aminoácidos da região do domínio característico da família AraC/ XylS (Figura 6A) e um esquema representativo (Figura 6B) de TagK e quatro proteínas de *E.coli* já caracterizadas e que pertencem a família: AraC, MarA e Rob e SoxS (GALLEGOS et al., 1997; RHEE et al., 1998; KWON et al., 2000; GRIFFITH e WOLF, 2002). Como podemos observar, as cinco proteínas possuem na região C- Terminal o domínio de 99 aminoácidos característico da família AraC/ XylS (GALLEGOS et al., 1997). Além deste domínio, podemos observar em azul, o domínio sensor, presente apenas na proteína AraC de *E. coli*. Com esta análise podemos inferir que TagK, assim como SoxS, MarA e Rob de *E. coli*, não possui o domínio de ligação ao ligante e o domínio de ligação ao DNA no mesmo polipeptídeo e, portanto, possivelmente precisa de outros reguladores que aumentem ou diminuam a transcrição.

Os dados de literatura que analisaram e descreveram o funcionamento de MarA e Rob mostraram alguns aminoácidos importantes para ligação desses fatores aos promotores e para manter a estrutura terciária das proteínas. Na Figura 6A estão destacados com asterisco os resíduos determinados experimentalmente que são importantes para a ligação do SoxS ao DNA (GRIFFITH e WOLF, 2002). Como podemos observar, os resíduos importantes para a ligação ao DNA estão, em sua maioria, localizados nos motivos HTH, com exceção do resíduo H98. Os resíduos Y39; W42; H43 e H107 apesar de serem importantes para a ligação de SoxS ao DNA não são conservados nas proteínas analisadas (GRIFFITH e WOLF, 2002). Os resíduos R96 e S40 são conservados em todos os cinco FT analisados, sendo o resíduo S40 localizado no motivo HTH da região N- terminal e o resíduo R96 no motivo da região C- terminal. Já o resíduo R46 é idêntico em MarA, Rob, SoxS e TagK, sendo também conservado em AraC, indicando que é possível que desempenhe a mesma função. Os resíduos Q45, K49 e K99 são idênticos em MarA, Rob, SoxS e AraC, no entanto, não são conservados em TagK.

Além dos resíduos importantes para a ligação do FT ao promotor, 19 resíduos foram descritos como importantes para formar uma estrutura hidrofóbica entre os domínios HTH, atuando

assim na estrutura terciária de SoxS (GRIFFITH; WOLF, 2002). Os resíduos (L44; F48; L72; F98 e P106) são conservados em todas as proteínas analisadas; os resíduos (I13, I16, I20, L24, M47, L56, M65, I79, L82 e F88) são idênticos em todas as proteínas analisadas; já os resíduos (L17, I60, F102) são idênticos em MarA, SoxS, Rob e TagK, mas não em AraC; E o resíduo L94 é idêntico em SoxS, Rob, TagK e AraC, no entanto não é conservado em MarA.

Podemos inferir que TagK, assim como SoxS, MarA e Rob, possui resíduos conservados, já descritos na literatura como importantes para a ligação da proteína ao promotor e para manter a estrutura terciária das proteínas.

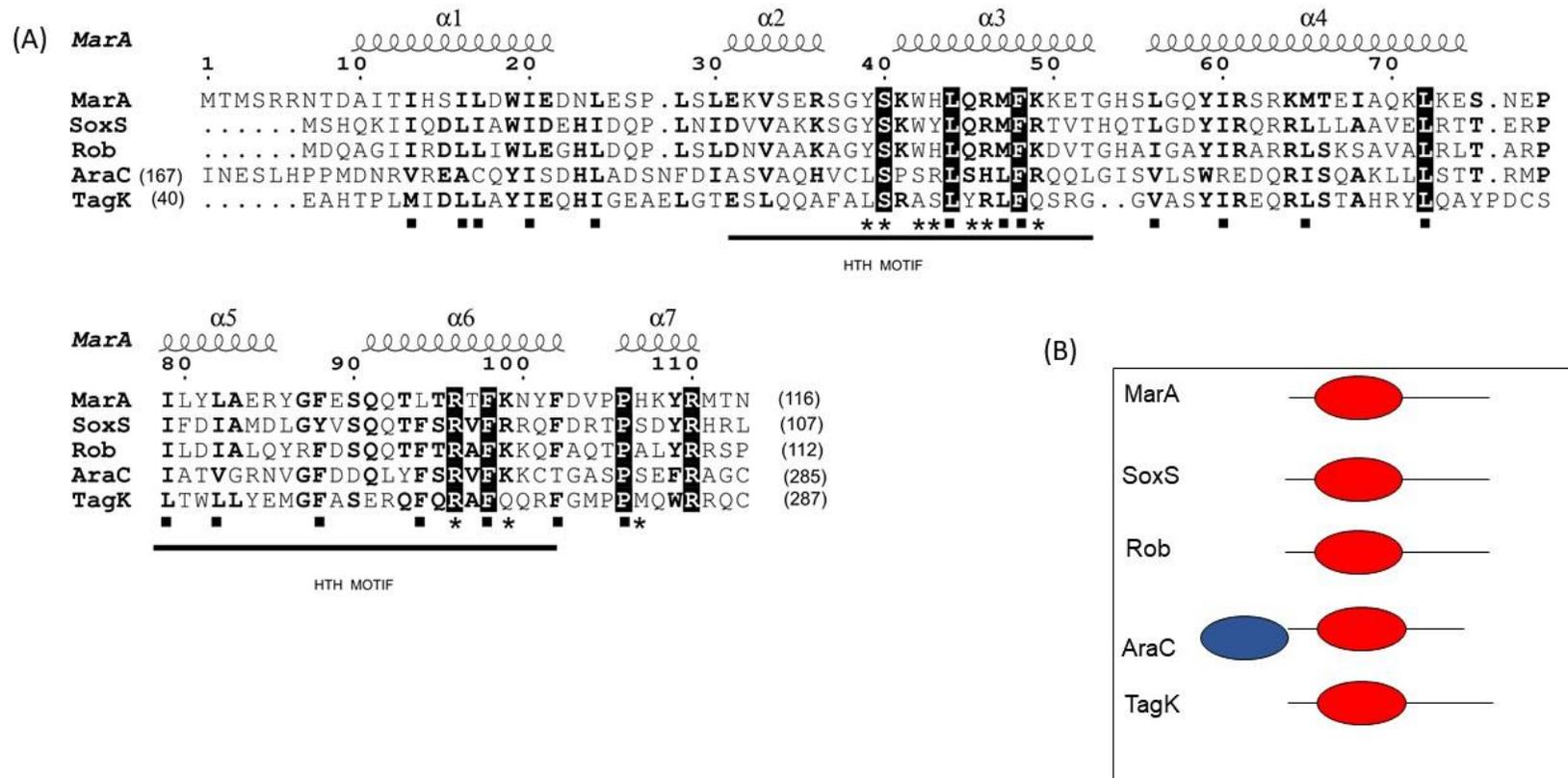


Figura 6- Alinhamento de proteínas pertencentes a família AraC. (A) alinhamento do domínio característico da família AraC/ XylS das proteínas: AraC (AAC73175); MarA (AAC74604.2); Rob (AAC77349) e SoxS (AAC77032) de *E. coli* e TagK (*xac4148*) de *X. citri*. Os resíduos idênticos em todas as proteínas estão realçados em fundo preto; os resíduos conservados estão destacados em negrito. As estruturas secundárias e a posição dos resíduos estão indicadas acima do alinhamento e foram preditas com a estrutura da proteína Rob (1D5Y); os motivos HTH presentes na proteína TagK que definem o domínio AraC estão destacados abaixo do alinhamento. Foram marcados com asterisco resíduos importantes para a ligação do fator de transcrição ao DNA, enquanto resíduos importantes para manter estrutura terciária da proteína estão destacados com quadrados pretos. O alinhamento dos aminoácidos foi feito no Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a análise da estrutura secundária no ESPrpt (<https://esprpt.ibcp.fr>) (B) Figura esquemática representando as proteínas alinhadas e os domínios presentes em cada uma delas, em azul o domínio sensor e em vermelho domínio característico da família AraC/ XylS.

Em seguida, foi analisado se TagK possui homologia com proteínas encontradas em outros organismos. Na Figura 7 podemos observar uma árvore que demonstra a relação filogenética existente entre TagK de *X. citri* e de proteínas com até 40% de similaridade, encontrados em outras bactérias.

As proteínas com uma maior proximidade filogenética à TagK formam um clado, sendo encontradas em: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1 (*xax*); *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*xcv*); *Xanthomonas perforans* (*xpe*); *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (*xfu*); *Xanthomonas vesicatoria* (*xve*) e todas as linhagens possuem SSVI pertencente ao grupo 3*, ou seja, possuem *pknS*, *ecfK* e *paar* (BAYER-SANTOS et al., 2019). Além disso, as proteínas destes organismos não possuem o domínio sensor (domínio representado na cor azul-Figura 7B), estão todas próximas ao contexto genômico de um SSVI e possuem orientação gênica oposta ao cluster II do SSVI que se inicia pelo gene *tssB*, assim como observado em *X. citri*.

É importante destacar que a proteína de *Xanthomonas phaseoli* (*xph*) forma um sub clado com a proteína de uma linhagem representativa *Xanthomonas* sp (*xan*) e que apesar de *xph* possuir SSVI e o homólogo de *tagK* estar próximo ao sistema, ele não é considerado funcional, já que não possui todos os genes necessários para o funcionamento do sistema (BAYER-SANTOS et al., 2019).

Os demais homólogos em Xanthomonadales fazem parte de clado distinto de TagK e são encontrados nas bactérias que não possuem SSVI (*Xanthomonas gardneri* (*xga*); *Xanthomonas hortorum* (*xhr*); *Xanthomonas arboricola* (*xar*); codificam um SSVI do grupo 3*** (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* CFBP7342 (*xoz*); *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* BLS256 (*xor*); ou, assim como *xph*, não possuem o conjunto completo de genes para formar um SSVI funcional (*Frateuria aurantia*, *fau*). Em todas as bactérias citadas os genes homólogos de *tagK* não estão próximos ao contexto genômico de um SSVI.

A proteína da espécie *fau* é a única encontrada em uma bactéria pertencente a Xanthomonadales que forma um clado com proteínas de espécies de outras ordens e que, apesar da proteína homóloga à TagK não possuir domínio sensor, ela se agrupa em um clado com outras homólogas com essa característica. Além disso, o homólogo de *tagK* de *fau* está próximo de um homólogo de *ecfK* e *pknS*, no entanto, ambos estão distantes do SSVI truncado encontrado nesta espécie (ausência de componentes essenciais do SSVI: *tagJ*, *paar* e *tssA*).

As espécies que possuem homólogos a TagK e não são Xanthomonadales fazem parte das ordens Oceanospirillales, Burkholderiales e Caulobacterales e não possuem homólogos de *ecfK* e *pknS* em seus genomas.

Com base nas análises de alinhamento e filogenia podemos concluir que as linhagens que possuem o SSVI do tipo 3* têm um homólogo de *tagK* associado ao SSVI, o que não ocorre com as bactérias que possuem SSVI do tipo 3***. Além disso, as linhagens *xar*, *xga*, *xhr*, apesar de não possuírem SSVI, possuem homólogos de *ecfK* e *pknS* próximos de *tagK*, indicando que esses três genes podem atuar de forma conjunta.

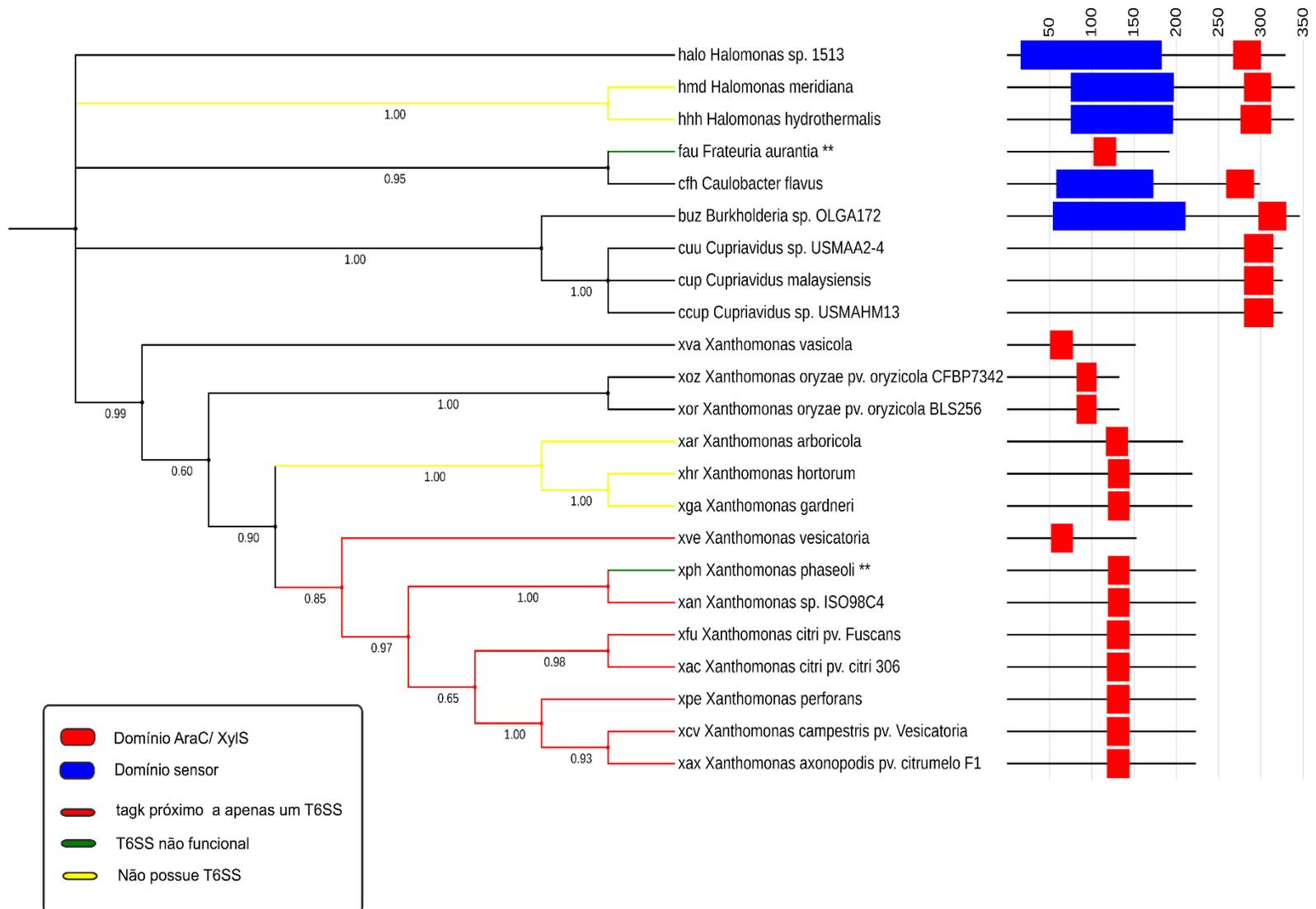


Figura 7- Relação filogenética de TagK e os homólogos com similaridade igual ou maior que 40%. As figuras esquemáticas do lado direito da imagem representam o tamanho da proteína e os domínios presentes em cada uma delas, conforme legenda. Os valores de bootstrap estão indicados nos ramos

4.2. Construção e caracterização fenotípica de linhagem mutante em *tagK* e da linhagem superexpressando *tagK*

A fim de caracterizar a função do fator de transcrição codificado pelo gene *tagK*, foi construída uma linhagem mutante que possui em seu cromossomo uma versão do gene truncado, em que foi mantida apenas uma pequena porção da região 5' e 3' do gene mantendo-se a matriz de leitura. A metodologia utilizada para a substituição da cópia selvagem por uma mutante se baseou em dois eventos de recombinação homóloga, conforme descrito no item 3.3 de Material e Métodos (Figura 5) (GAO et al., 2006). No primeiro evento de recombinação, as linhagens possuem a cópia selvagem e a versão deletada do gene, além do plasmídeo suicida pNPTS138 inserido no cromossomo. As linhagens resultantes de um segundo evento de recombinação sofrem a perda do plasmídeo e mantêm uma das cópias do gene.

Na Figura 8, podemos observar os produtos obtidos por PCR e analisados em gel de agarose. Na linhagem que sofreu a primeira recombinação homóloga foi possível observar a amplificação de duas bandas, uma correspondente ao gene selvagem (1.918 pb) e outra ao gene truncado (1.396 pb) (Figura 5- poço 3). Após o segundo evento de recombinação foi possível detectar apenas o fragmento correspondente ao gene truncado (Figura 5- poços 4 e 5), já que a cópia selvagem foi perdida, durante o evento de recombinação. A construção assim obtida representa a deleção de 552 pb da região interna do gene (184 aminoácidos), foi mantido apenas 120 pb (39 resíduos- MALLFSVDQGTGPGEWAAGSIRMSSSSH da região N-terminal e AQPEPMESEAL da região C-terminal).

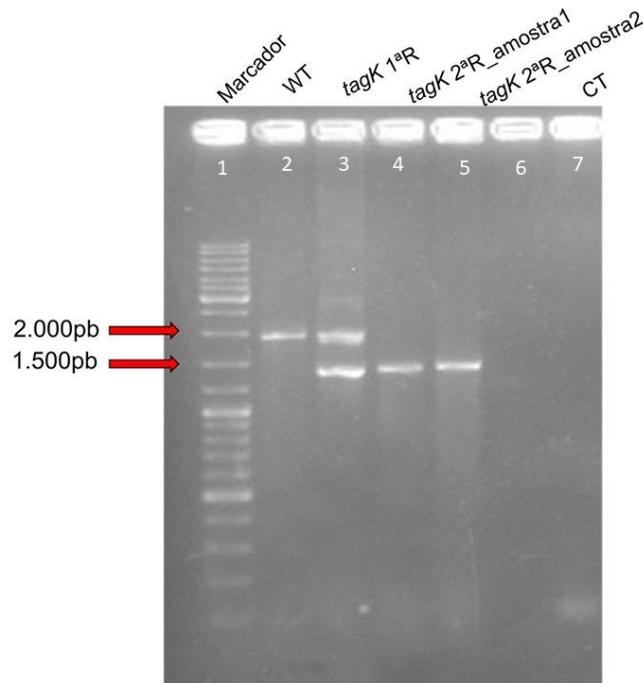


Figura 8- Confirmação da linhagem $\Delta tagK$: Gel de agarose 1% com amostras de PCR para a confirmação da presença das cópias de *tagK* nas linhagens selecionadas após os eventos de primeira e segunda recombinação durante a construção de $\Delta tagK$. Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos fragmentos foram: FW_F1_4148 e RV_F2_4148. (1) Marcador de peso molecular Gene Ruler DNA ladder (Thermo Scientific) (2) linhagem selvagem utilizada como controle positivo da reação (3) linhagem obtida após primeira recombinação (4) e (5) linhagens obtidas após a segunda recombinação, a linhagem do poço 4 foi utilizada para os demais experimentos (6) poço vazio (7) controle sem DNA genômico utilizado como controle negativo da reação.

Em seguida, foi avaliado o efeito da deleção de *tagK* na expressão de RNAm de genes regulatórios e estruturais do SSVI, por meio de ensaios de qRT-PCR. O gene *tssB* codifica uma proteína que interage com TssC formando a bainha interna do SSVI (WANG et al., 2015), enquanto *vgrG* codifica uma proteína que forma a extremidade do tubo de secreção e atua no recrutamento de efetores (HACHANI et al., 2014) e estão localizados nos clusters 2 e 1, respectivamente (Figura 2). Os genes *clpV* e *ecfK* codificam proteínas regulatórias que atuam na atividade e expressão do SSVI, respectivamente. ClpV é responsável por reciclar o tubo formado pela proteína Hcp após um evento de ejeção do complexo (BASLER et al., 2012). Já o sigma EcfK é necessário para a indução dos genes do SSVI (BAYER-SANTOS et al. 2018) e em estudos anteriores feitos pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que *tagK* faz parte dos genes regulados por este sigma. Esses genes foram selecionados por serem essenciais para o funcionamento do sistema e estarem presentes em diferentes clusters (Figura 2). Como é

possível observar na Figura 9, a linhagem mutante em *tagK* não apresentou alteração (> 2 vezes) nos níveis de RNAm de genes do SSVI, ou seja, a expressão foi semelhante a encontrada na linhagem selvagem.

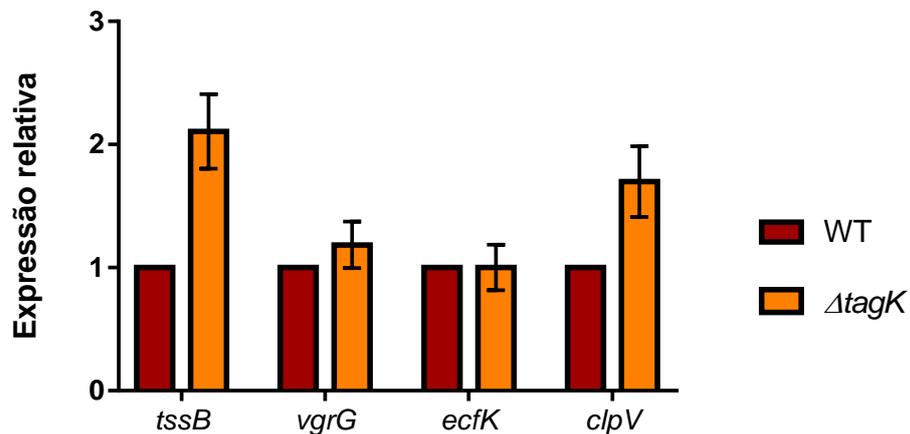


Figura 9- A deleção de *tagK* não altera a expressão de genes do SSVI: Ensaios de qRT-PCR para análise de RNAm de genes que codificam componentes essenciais do SSVI (*tssB*, *vgrG*, *ecfK* e *clpV*), as culturas saturadas das linhagens WT e $\Delta tagK$ foram diluídas para a $DO_{600nm} = 0,1$ e foram coletadas após aproximadamente 5 h ou até atingirem a $DO_{600nm} = 0,5$. Dados representam a média de três réplicas independentes e o erro padrão está indicado pelas barras, as amostras foram normalizadas com o gene *rpoC* e a linhagem WT foi utilizada como referência para a expressão relativa.

Além da análise da linhagem com deleção de *tagK*, foi obtida a linhagem superexpressando o gene, que possui o plasmídeo multicópia pBRA contendo uma cópia do gene *tagK* sob controle de promotor que pode ser induzido por arabinose. Com isto, pretendia-se determinar se a expressão de cópias adicionais do fator de transcrição seria capaz de alterar a expressão dos genes do SSVI. Os resultados obtidos demonstram que mesmo antes da indução, ou seja, antes da adição da arabinose às culturas (ponto 0h), já foi possível observar uma expressão relativa 100 vezes maior nos níveis de RNAm do gene *tagK* na linhagem que possuía a cópia adicional do gene, comparada à linhagem selvagem (Figura 10), utilizada como referência, indicando que os promotores foram ativos mesmo na ausência de indutor (arabinose), como já observado anteriormente para expressão de genes no vetor pBRA (BAYER-SANTOS et al., 2018). Após a indução de 30 minutos, o aumento da transcrição passou a ser 30.000 vezes maior que o observado na linhagem WT utilizada como controle.

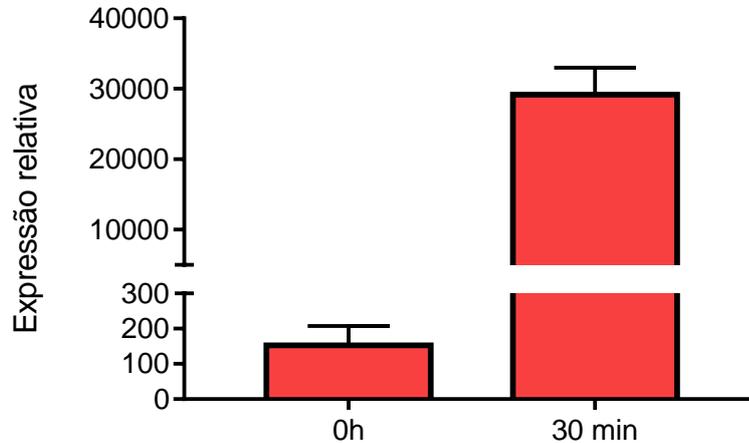


Figura 10- A presença de cópia extra de *tagK* no vetor pBRA promove aumento nos níveis de mRNA de *tagK* mesmo na ausência do agente indutor arabinose. qRT-PCR para análise dos níveis de RNAm de *tagK* na linhagem superexpressando *tagK* em vetor induzível por arabinose (WT *tagK*) em meio LB antes da indução (0h) e após 30 min de indução com arabinose 0,3% em culturas de fase exponencial de crescimento. Dados representam a média de três réplicas independentes e o erro padrão está indicado pelas barras, as amostras foram normalizadas com o gene endógeno *rpoC*, a linhagem WT (contendo o pBRA vazio) foi utilizada como referência para a expressão relativa.

Além da análise do RNAm do gene *tagK*, foi analisada a expressão de genes do SSVI. Antes da indução, ou seja, na condição 0 h, já foi possível observar um aumento de aproximadamente 41,8 vezes na expressão de RNAm de genes estruturais como *vgrG* e um aumento de 102 vezes do RNAm de *clpV*; já a expressão de *tssB* teve um aumento de 726 vezes comparada a linhagem WT utilizada como controle (Figura 11). O único gene analisado em 0h e que não teve alteração na expressão foi o fator sigma *ecfK*. Após 30 minutos de indução com arabinose, os genes *tssB*, *clpV* e *vgrG* apresentaram incremento na indução relativa, em relação às amostras não induzidas. O sigma *ecfK* continuou sendo o único gene analisado que não teve sua expressão alterada após 30 minutos de indução (Figura 11).

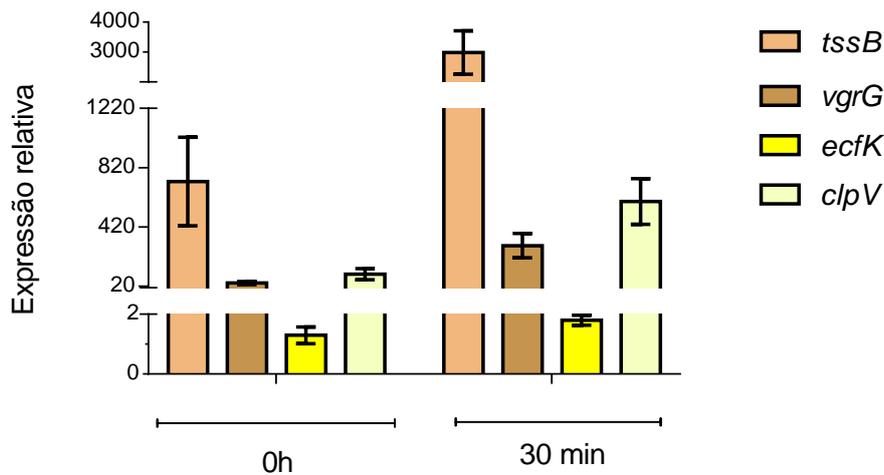


Figura 11- A superexpressão de *tagK* aumenta os níveis transcricionais de genes essenciais para o funcionamento do SSVI, sem afetar a expressão de *ecfK*. qRT-PCR para análise dos níveis de RNAm de componentes essenciais do SSVI (*tssB*, *vgrG*, *ecfK* e *clpV*) na linhagem superexpressando *tagK* (WT *tagK*) em meio LB antes da indução (0h) e após 30 min de indução com arabinose 0,3% em culturas de fase exponencial de crescimento. Dados representam a média de três réplicas independentes e o erro padrão está indicado pelas barras, as amostras foram normalizadas com o gene endógeno *rpoC*, a linhagem WT (expressando o pBRA vazio) foi utilizada como referência para a expressão relativa.

Os dados obtidos neste experimento indicaram que TagK foi suficiente para promover aumento na expressão dos genes do SSVI. Podemos ainda inferir que esta relação existiu nos dois clusters que compõe o SSVI de *X. citri*, já que *vgrG* está no cluster 1 e *clpV* e *tssB* estão no cluster 2 do SSVI de *X. citri*.

Os resultados ainda indicaram que EcfK atua antes do fator de transcrição TagK na via de regulação dos genes do SSVI, já que estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que EcfK tem papel essencial para a regulação dos RNAm de genes que codificam os componentes do SSVI (BAYER-SANTOS et al. 2018), ou seja, quando ocorreu aumento da expressão de *tagK* não foi necessário que ocorresse o aumento de *ecfK* para que genes essenciais do SSVI fossem transcritos.

4.3. Caracterização fenotípica das linhagens superexpressando *tagK* e *ecfK* em contato com a ameba de solo *Dictyostelium discoideum*

Dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa (BAYER-SANTOS et al., 2018) demonstraram que o SSVI tem papel essencial para a resistência a predação pela ameba *D. discoideum*, portanto, o papel de TagK neste fenótipo foi avaliado por ensaios de formação de

placa de fagocitose. Neste ensaio, as linhagens de bactérias e amebas foram cocultivadas em meio sólido em placas de 24 poços. Para isto, um tapete de bactérias foi feito, pelo espalhamento das culturas de interesse em meio SM sólido. Em seguida, quantidades conhecidas de amebas foram colocadas no centro dos poços e as placas incubadas por até 5 dias. A capacidade de predação da ameba foi avaliada pelo tamanho do halo formado sobre o tapete bacteriano, ou seja, quanto maior o halo mais suscetível à predação foi a linhagem analisada.

Como pode ser observado na Figura 12A, a linhagem $\Delta tagK$ se mostrou mais sensível à predação por ameba, tendo fenótipo semelhante a linhagem $\Delta ecfK$, já descrita anteriormente como mais suscetível à predação, se comparada a linhagem WT (BAYER-SANTOS et al., 2018). A complementação da linhagem $\Delta tagK$ pela presença de cópia selvagem do gene no vetor pBRA ($\Delta tagK tagK$) restaurou o fenótipo selvagem, indicando que *tagK* foi suficiente para a resistência da bactéria a predação pela ameba *D. discoideum*.

Também foi avaliado o efeito da superexpressão de uma versão constitutivamente ativa do gene *ecfK* na linhagem $\Delta tagK$ já que em estudos de nosso grupo foi demonstrado que o sigma EcfK se torna ativo em sua forma fosforilada e que neste estado é capaz de aumentar a expressão dos genes do SSVI (BAYER-SANTOS et al., 2018). Para isso, foi utilizada uma linhagem que possui a treonina da posição 51 da proteína alterada por um ácido glutâmico ($\Delta ecfK$ T51E), mimetizando, assim, um estado fosforilado do sigma EcfK. Foi avaliado se a superexpressão da versão fosfomimética de *ecfK* no mutante *tagK* ($\Delta tagK$ T51E) seria suficiente para reestabelecer o fenótipo selvagem. A complementação com o *ecfK* ativo não foi suficiente para reestabelecer o fenótipo selvagem, já que a linhagem apresentou suscetibilidade a predação (Figura 12A).

Dando continuidade à caracterização dos fenótipos de linhagens mutantes, foi analisado se a expressão do gene *tagK* sob controle de promotor regulado por arabinose no vetor pBRA seria suficiente para restaurar o fenótipo selvagem nas linhagens com deleção de *ecfK*. Na figura 12B é possível observar que a linhagem $\Delta ecfK$ superexpressando o gene *tagK* ($\Delta ecfK tagK$) apresentou fenótipo semelhante a linhagem $\Delta ecfK$ T51E, ou seja, semelhante a linhagem selvagem. Os resultados obtidos indicam que o gene *tagK* foi suficiente para restabelecer o fenótipo da linhagem que não possui o fator sigma EcfK funcional.

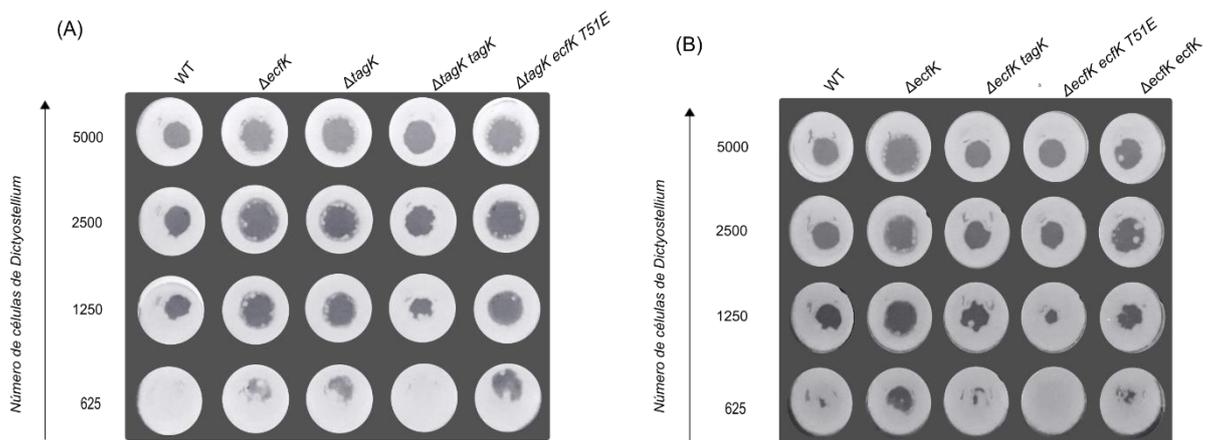


Figura 12- *tagK* é necessário para a sobrevivência de *X. citri* em contato com a ameba de solo *D. discoideum*

(A) análise da sensibilidade a predação de diferentes linhagens de interesse em placas de fagocitose. O fenótipo selvagem não pode ser restabelecido no mutante $\Delta tagK$ pela superexpressão do sigma *ecfK* constitutivamente ativo ($\Delta ecfK$ pBRA *ecfK* T51E). (B) Placa de fagocitose em que é possível observar que a superexpressão do *tagK* é suficiente para restabelecer o fenótipo selvagem da linhagem $\Delta ecfK$. Figura representativa dos ensaios realizados em triplicata biológica.

Em seguida, analisamos se o cocultivo de *X. citri* e *D. discoideum* promove alteração nos níveis de RNAm de *tagK*, indicando seu papel na capacidade da bactéria em resistir à predação por ameba, complementando assim os resultados fenotípicos já observados nos experimentos anteriores. Para isso, a expressão de *tagK* após 24 h de contato de *X. citri* com *D. discoideum* foi analisada por qRT-PCR.

Como podemos observar na Figura 13, após 24h de contato da linhagem WT com *D. discoideum* ocorreu um aumento nos níveis de RNAm de *tagK*, no entanto, o mesmo não ocorreu com a linhagem $\Delta ecfK$, ou seja, não foi possível observar um aumento da expressão de *tagK* nesta linhagem. A indução de *tagK* foi restaurada pela complementação de $\Delta ecfK$ com cópia do gene *ecfK* no vetor pBRA, indicando que EcfK é necessário para a indução da transcrição de *tagK* em resposta ao contato com *D. discoideum*.

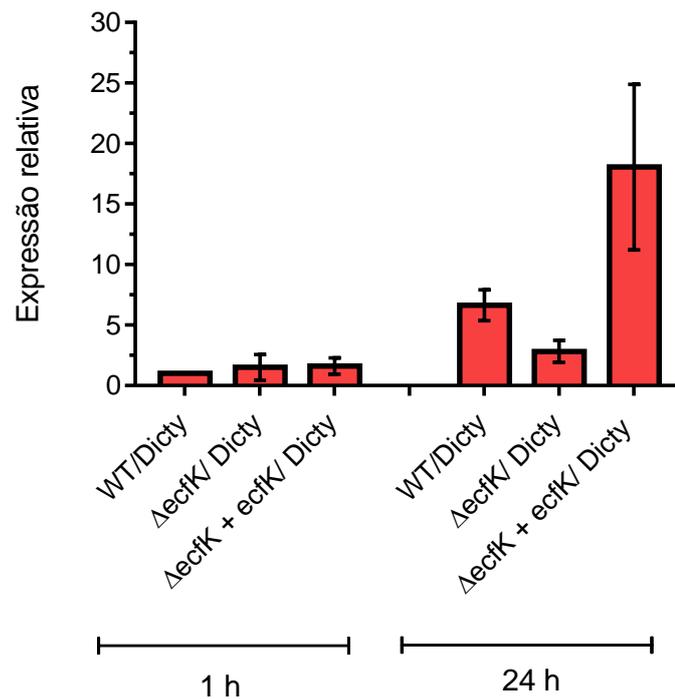


Figura 13- *tagK* é induzido durante o contato de *X. citri* com *D. discoideum* de forma dependente de EcfK
 Análise por qRT-PCR da expressão de *tagK* em diferentes linhagens em contato com *D. discoideum* por 1 h e 24 h em meio SM sólido. Dados representam a média de três réplicas independentes e o erro padrão está indicado pelas barras. As amostras foram normalizadas com o gene *rpoC*. A amostra WT em contato com *D. discoideum* por 1 h foi utilizada como referência para as análises relativas.

Em seguida, os níveis de RNAm de genes do SSVI foram analisados nas linhagens com os genes *tagK* e *ecfK* deletados e em cocultivo com *D. discoideum*. Com esta análise, foi possível inferir se os fenótipos de suscetibilidade observados nos ensaios de placa de fagocitose poderiam ser explicados pela alteração de expressão de genes do SSVI. Como demonstrado na Figura 14, o cocultivo da linhagem WT com *D. discoideum* por 24h promoveu um aumento de 17,97 vezes do RNAm de *clpV* e de 8,33 vezes do RNAm de *vgrG*, confirmando o que já havia sido observado em dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa (BAYER-SANTOS et al., 2018).

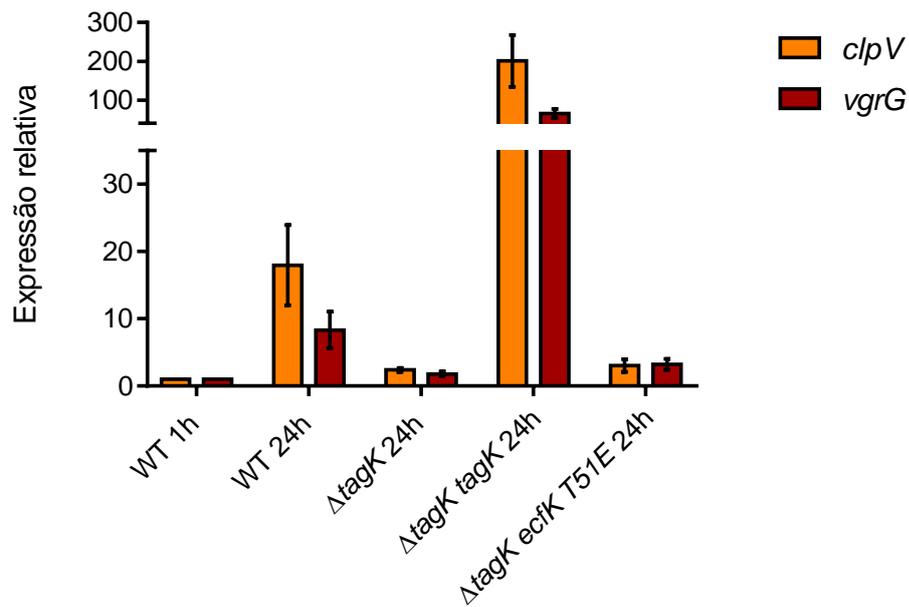


Figura 14- *tagK* é necessário para que ocorra indução de genes do SSVI durante o cocultivo de *X. citri* com *D. discoideum*. qRT-PCR para análise dos níveis de RNAm de componentes essenciais do SSVI (*vgrG* e *clpV*) em amostras obtidas após contato das bactérias com a ameba de solo *D. discoideum* em meio SM após 1 hora e após 24 horas de contato. Dados representam a média de três réplicas independentes e o erro padrão está indicado pelas barras, as amostras foram normalizadas com o gene endógeno *rpoC* e a linhagem WT (expressando o pBRA vazio) após 1 hora de contato com a *D. discoideum* foi utilizada como referência para a expressão relativa.

O aumento nos níveis de RNAm de genes do SSVI não foi observado na linhagem $\Delta tagK$, o que corrobora o fenótipo observado no ensaio de placa de fagocitose (Figura 12). Além disto, complementação com *tagK* ($\Delta tagK tagK$) promoveu um aumento de 200 vezes nos níveis de RNAm de *clpV* e 65 vezes do RNAm de *vgrG*. Os dados de qRT-PCR corroboram os resultados já obtidos no experimento de placa de fagocitose (Figura 12), já que a complementação da linhagem com *tagK* deletado ($\Delta tagK tagK$) restabeleceu o fenótipo selvagem, indicando que *tagK* atuou na ativação de genes do SSVI e que o aumento desses genes foi essencial para que as linhagens de *X. citri* fossem resistentes à predação pela ameba *D. discoideum*.

A superexpressão da versão ativa do sigma *ecfK* na linhagem $\Delta tagK$ ($\Delta tagK ecfKT51E$) apresentou um aumento de 3,06 com um erro de 0,94 de *clpV* e 3,22 vezes com um erro de 0,79 de *vgrG*. Apesar de ter ocorrido um aumento dos níveis de RNAm, ele não foi suficiente para restabelecer o fenótipo selvagem (Figura 12), além disso, o aumento está muito próximo do limite de 2 vezes, considerado mínimo para uma expressão diferencial indicando

mais uma vez que *tagK* é necessário para a resistência à predação de *D. discoideum* e que atua após *ecfK* na via de regulação dos genes do SSVI.

Em seguida, foi analisado por ensaios de qRT-PCR se a linhagem $\Delta ecfK$ superexpressando *tagK* ($\Delta ecfK tagK$) ou *ecfK* ativo ($\Delta ecfK ecfK T51E$) apresenta níveis aumentados de RNAm de genes do SSVI durante o cocultivo com *D. discoideum*. Como podemos observar na Figura 15, a cópia de *ecfK T51E* ($\Delta ecfK ecfK T51E$) restabeleceu o fenótipo de expressão, demonstrando aumento de 110 vezes do RNAm de *clpV* e de 25,9 vezes de *vgrG*, ou seja o *ecfK* ativo foi capaz de aumentar a transcrição de RNAm de genes do SSVI, assim como já observado anteriormente (BAYER-SANTOS et al., 2018). A superexpressão de *tagK* ($\Delta ecfK tagK$) também foi suficiente para restaurar o aumento dos níveis de RNAm dos genes em resposta à incubação com *D. discoideum* (67,6 vezes para *clpV* e 33,8 vezes para *vgrG*).

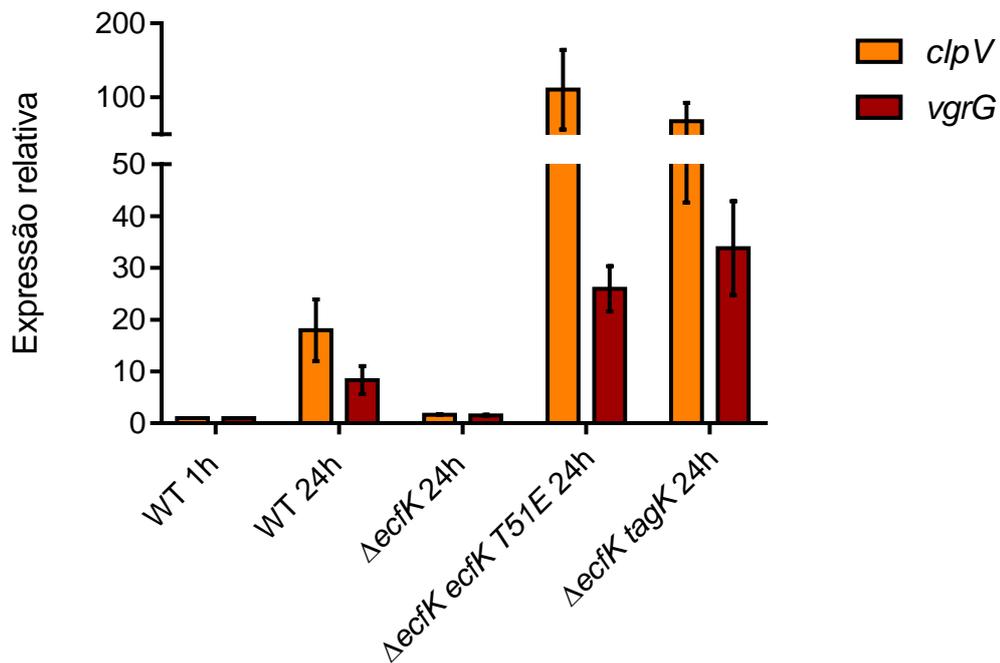


Figura 15- *tagK* é suficiente para suprir o efeito da deleção do sigma *ecfK*. qRT-PCR para análise dos níveis de RNAm de genes do SSVI (*vgrG* e *clpV*) em amostras obtidas após contato das bactérias com a ameba de solo *D. discoideum* em meio SM após 1 hora e após 24 horas de contato. Dados representam a média de três réplicas independentes e o erro padrão está indicado pelas barras, as amostras foram normalizadas com o gene endógeno *rpoC*, a linhagem WT (expressando o pBRA vazio) após 1 hora de contato com a *D. discoideum* foi utilizada como referência para a expressão relativa.

Conclui-se que, assim como observado nos experimentos de placa de fagocitose (Figura 12), a linhagem que não possui *tagK* é mais suscetível à predação que a linhagem WT, já que na ausência deste fator de transcrição não ocorreu aumento da expressão dos genes do SSVI, que são necessários para a resistência à predação por ameba. Além disso, podemos concluir que *tagK* foi capaz de restabelecer o fenótipo selvagem nas linhagens que não possuíam o sigma *ecfK*, no entanto, o sigma *ecfK* ativo não foi capaz de ativar a transcrição dos genes do SSVI nas linhagens que não possuíam *tagK*.

Em seguida, a expressão de *ecfK* foi analisada em resposta a coincubação com *D. discoideum*. Como podemos observar na Figura 16, a expressão de *ecfK* apresentou aumento de aproximadamente 6 x após 24h de incubação com *D. discoideum*. A análise da expressão de *ecfK* na linhagem $\Delta tagK$ também demonstrou aumento, embora menor em comparação a linhagem WT, de aproximadamente 4 x. Já a expressão relativa dos níveis de RNAm de *ecfK* na linhagem $\Delta tagK tagK$ é semelhante a observada na linhagem selvagem.

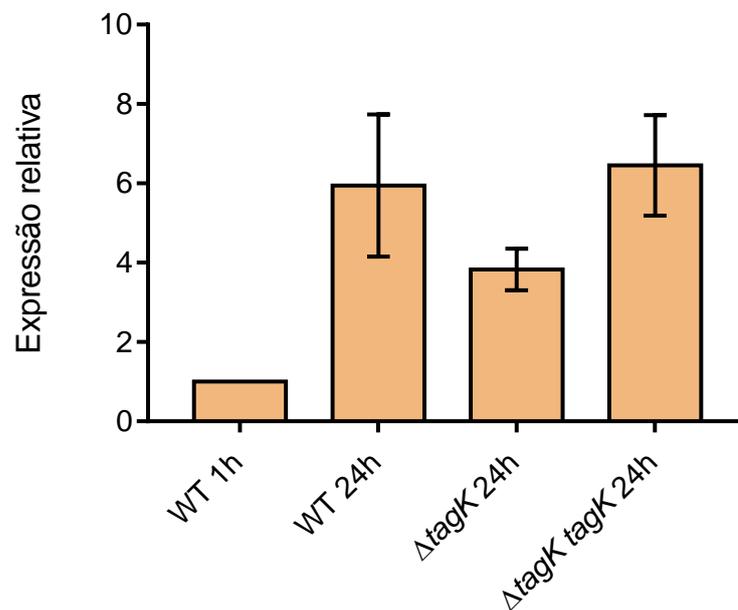


Figura 16- *ecfK* é induzido em contato com *D. discoideum* em linhagens com *tagK* deletado. Análise por qRT-PCR dos níveis de RNAm de *ecfK* em amostras obtidas após contato das bactérias com a ameba de solo *D. discoideum* em meio SM após 1 hora e após 24 horas de contato. Dados representam a média de três réplicas independentes e o erro padrão está indicado pelas barras. As amostras foram normalizadas com o gene endógeno *rpoC* e a linhagem WT (expressando o pBRA vazio) após 1 hora de contato com a *D. discoideum* foi utilizada como referência para a expressão relativa.

Os dados de expressão gênica da bactéria em contato com a ameba complementaram os dados fenotípicos apresentados, confirmando que o fator de transcrição *tagK* é necessário para a resistência de *X. citri* à predação pela ameba *D. discoideum* e que *ecfK* atua antes de *tagK* na via de regulação da transcrição dos genes do SSVI de *X. citri*.

4.4. Expressão de proteínas em linhagens superexpressando *tagK* e *ecfK*.

Os ensaios de predação por ameba mostraram que *tagK* é suficiente para restabelecer o fenótipo selvagem da linhagem $\Delta ecfK$ em resposta a interação com *D. discoideum*. Então, analisamos se a presença de cópias extras de *tagK* a partir do vetor pBRA é suficiente para alterar os níveis de RNAm de genes do SSVI na linhagem $\Delta ecfK$ em meio de cultura LB acrescido do indutor arabinose. Dois genes foram analisados: *vgrG*, presente no cluster 1, e *clpV*, presente no cluster 2 do SSVI (Figura 2). As análises de qRT-PCR foram realizadas conforme descrito no item 3.4, somente as amostras após 30 minutos de indução foram analisadas, já que estava sendo avaliado se ocorreria o aumento e não qual seria a diferença existente entre os pontos 0 h e 30 minutos. Os resultados obtidos demonstram que só existiu diferença na expressão de *clpV* e *vgrG* nas linhagens superexpressando *tagK* ($\Delta tagK tagK$; $\Delta ecfK tagK$), enquanto a presença da versão ativa do sigma *ecfK* a partir do vetor pBRA na linhagem com deleção do gene *tagK* ($\Delta tagK ecfK$ T51E) não foi suficiente para aumentar a expressão dos genes do SSVI. Os resultados complementam o que foi observado na condição de contato com ameba e no experimento de placa de fagocitose (Figura 12, 14 e 15).

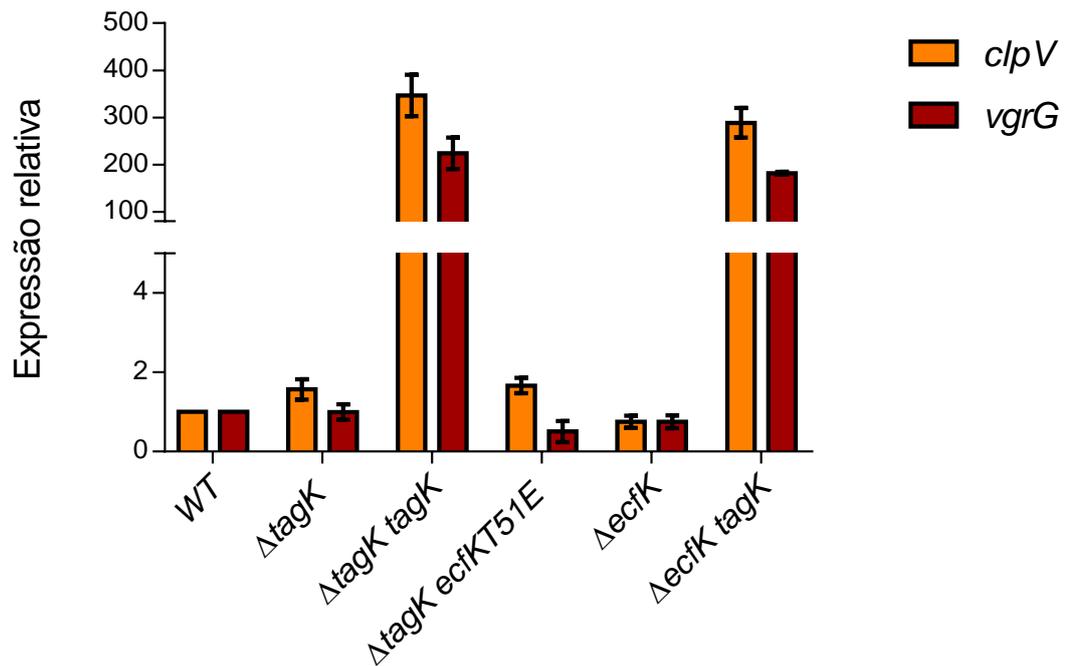


Figura 17- *tagK* é capaz de aumentar a expressão de genes do SSVI mesmo na ausência de *ecfK*. Análise por qRT-PCR da expressão de componentes do SSVI (*clpV* e *vgrG*). Dados representam a média de três réplicas independentes o erro padrão está indicado pelas barras, as amostras foram normalizadas com o gene endógeno *rpoC*, a amostra WT (contendo o pBRA vazio) induzida por 30 min com 0,3% de arabinose foi utilizada como referência para expressão relativa.

Em seguida, avaliamos se a superexpressão de *tagK* leva a aumento nos níveis intracelulares de proteínas do SSVI, já que os grupos gênicos que compõe os SSVI normalmente são fortemente regulados em nível transcricional e pós transcricional (CIANFANELLI, MONLEZUN, e COULTHURST 2016). Além disto, dados obtidos pelo grupo de pesquisa demonstraram que, apesar da expressão do fator sigma *ecfK* em sua versão constitutivamente ativa ter promovido aumento da transcrição dos genes do SSVI de *X. citri* (BAYER-SANTOS et al. 2018), não ocorreu um acúmulo das proteínas do sistema nestas condições (CESETI, L, dados não publicados).

Para as análises de expressão, foi utilizada a linhagem com o gene *xac4126* (*paar*) fusionado ao epítipo HA (WT::*paarHA*) superexpressando os genes de interesse. Na Figura 18 podemos observar aumento nos níveis da proteína Hcp na linhagem com cópias extras de *tagK* no vetor pBRA (WT *tagK*), no entanto, não foi possível observar um aumento de Hcp na linhagem com o *ecfK* ativo (WT *ecfK T51E*) no mesmo vetor. Hcp é uma das proteínas essenciais para o funcionamento do SSVI e que está localizada no cluster 2 do SSVI de *X. citri*.

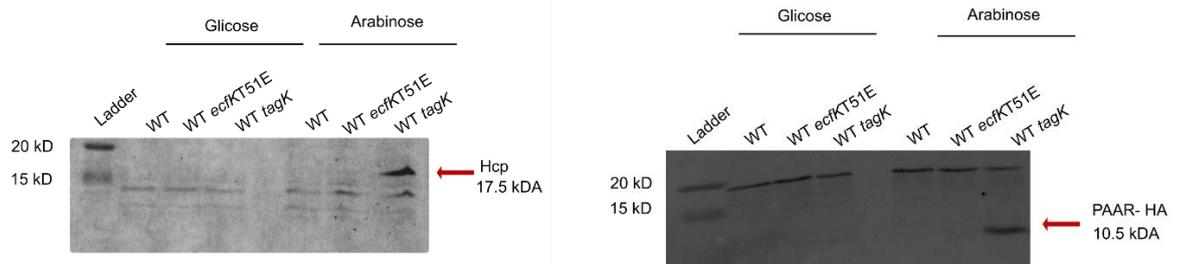


Figura 18- A superexpressão de *tagK* aumenta a expressão das proteínas Hcp e PAAR Análise de imunoblot com a linhagem WT::*paar*:HA, contendo o vetor pBRA para super expressão da versão ativa de *ecfK* (WT *ecfK T51E*) ou o plasmídeo contendo *tagK* (WT *tagK*). Para a análise foram usados o anticorpo policlonal anti Hcp (produzido a partir de peptídeo sintético pela empresa RheaBiotech) (figura à esquerda) e o anticorpo monoclonal anti há (painel à direita). As bandas correspondentes às proteínas de interesse estão indicadas com setas. As amostras foram coletadas após aproximadamente 5 horas de indução ou repressão (arabinose e glicose, respectivamente).

Na figura 18 podemos observar a análise da expressão da proteína PAAR fusionada a cauda HA na linhagem WT *tagK*. Observou-se um aumento da produção da proteína PAAR, que juntamente com VgrG e Hcp atua na montagem do tubo do sistema (CIANFANELLI et al., 2016). O aumento de HA não foi observado na linhagem superexpressando o *ecfK* ativo (WT *ecfK T51E*).

4.5. Análise de transcriptoma

Em seguida, foi realizada uma análise de sequenciamento de RNAm (RNA-Seq) com linhagens superexpressando *tagK* (WT *tagK*; Δ *ecfK tagK*), a fim de identificar os genes presentes no *regulon* do fator de transcrição. A linhagem selvagem superexpressando pBRA vazio foi utilizada como controle e o experimento foi feito com três réplicas biológicas de cada uma das linhagens. Os resultados obtidos foram analisados em colaboração com o Dr. Alan Lorenzetti, sob orientação da Profa Dra Tie Koide (Dep de Bioquímica – FMRP/USP).

Foi possível fazer o alinhamento de aproximadamente 70% a 90% das *reads* obtidas em cada uma das bibliotecas. Com a análise do *heatmap* apresentado na Figura 19, podemos observar que as réplicas biológicas não foram agrupadas como esperado, já que as triplicatas biológicas das mesmas linhagens deveriam ser mais similares entre si do que entre as outras linhagens, o que não ocorreu, pois podemos observar que as amostras da réplica 1

(WT réplica 1, $\Delta ecfK$ *tagK* réplica 1, WT *tagK* réplica 1) são mais similares entre si do que entre as outras réplicas das mesmas linhagens. O agrupamento entre linhagens diferentes pode ter sido ocasionado pela expressão diferencial de poucos genes dentro do contexto global do transcriptoma, como será apresentado a seguir.

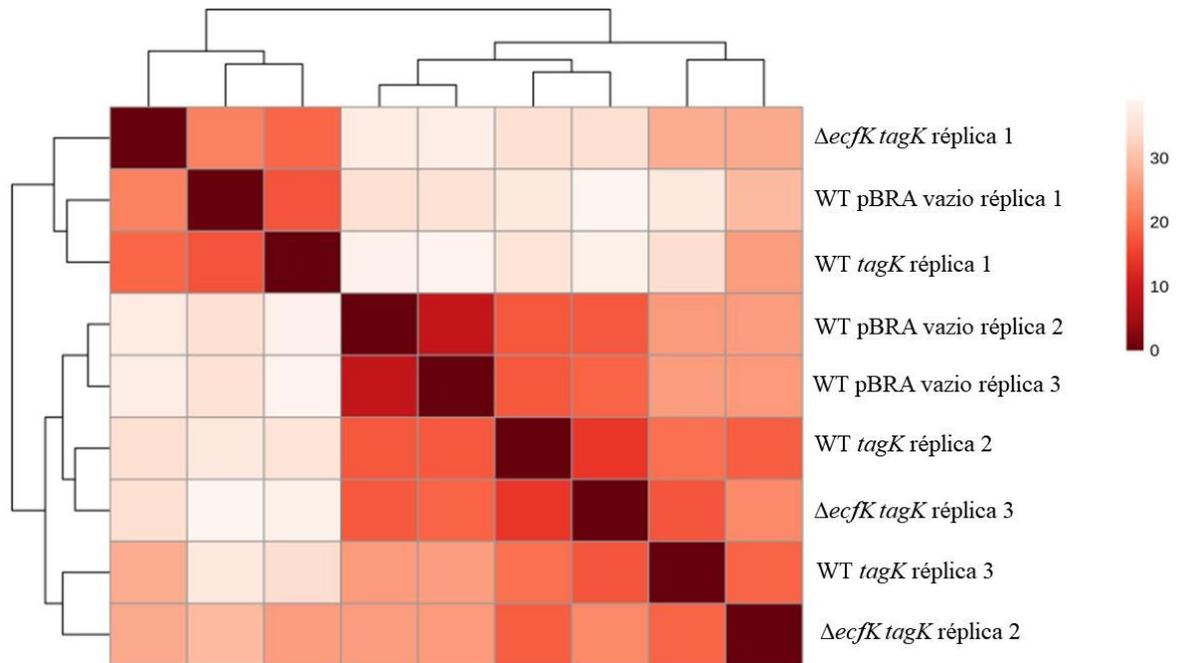


Figura 19- Heatmap dos resultados de RNA-Seq de cada uma das réplicas biológicas de cada linhagem analisada. A intensidade da coloração vermelha indica a similaridade entre as amostras analisadas, quanto mais intensa a coloração maior é a similaridade entre as amostras. Na diagonal está a distância da amostra em relação a ela mesma, ou seja 0 (vermelho escuro).

A análise de expressão diferencial comparando a linhagem superexpressando *tagK* e a linhagem contendo o vetor vazio permitiu validar os dados de expressão gênica já apresentados anteriormente (Figura 11), ou seja, a superexpressão de *tagK* levou a expressão diferencial dos genes do SSVI previamente analisados por qRT-PCR. Observou-se que o regulon de TagK contém apenas os genes dos clusters I e II do SSVI incluindo genes que codificam um SSV inserido no cluster do SSVI (*xac4113* e *xac4114*) (Figura 2). A exceção dentro dos clusters foram os genes *pknS* e *ecfK*, que não apresentaram expressão diferencial.

Como podemos observar na Tabela 4, o regulon de *tagK* é composto de 25 genes e não foram identificados genes regulados negativamente na condição de superexpressão de

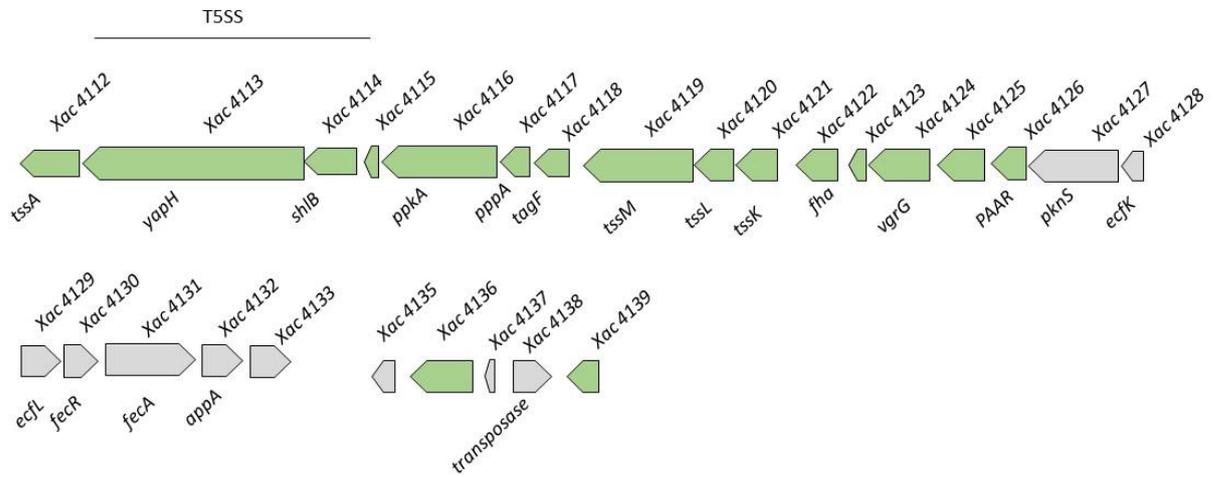
tagK, indicando que, assim como a maioria dos fatores de transcrição da família AraC (GALLEGOS et al., 1997), *tagK* é um regulador positivo da expressão do SSVI de *X. citri*.

Tabela 4. Genes regulados por TagK

Gene	Expressão relativa
<i>xac4139</i>	11,20
<i>xac4115</i>	12,12
<i>yapH (xac4113)</i>	13,81
<i>xac4136</i>	17,30
<i>slhB (xac4114)</i>	17,86
<i>tssA (xac4112)</i>	20,09
<i>ppkA (xac4116)</i>	29,11
<i>xac4125</i>	35,37
<i>xac4123</i>	40,68
<i>pppA (xac4117)</i>	47,99
<i>tagF (xac4118)</i>	59,89
<i>tssM (xac4119)</i>	72,05
<i>vgrG (xac4124)</i>	76,25
<i>tssK (xac4121)</i>	77,14
<i>fha (xac4122)</i>	80,05
<i>paar (xac4126)</i>	95,93
<i>tssG (xac4141)</i>	100,02
<i>tssE (xac4143)</i>	128,60
<i>tssL (xac4120)</i>	136,57
<i>clpV (xac4140)</i>	141,88
<i>tssF (xac4142)</i>	143,99
<i>tssC (xac4146)</i>	153,67
<i>tssB (xac4147)</i>	183,73
<i>hcp (xac4145)</i>	200,42
<i>tagJ (xac4144)</i>	285,13
<i>tagK (xac4148)</i>	1002,7

Na Figura 20 podemos observar a organização gênica do SSVI de *X. citri* e em verde estão os genes regulados positivamente por este fator de transcrição. Observa-se que todos os genes presentes nos dois *clusters* do SSVI e o SSV inserido estão presentes no *regulon* do *tagK*. Apenas genes na região entre os dois *clusters* não foram regulados por *tagK*, dentre eles estão genes que não possuem função conhecida (*xac4132*; *xac4133*; *xac4135*; *xac4137*, *xac4138*), além deles, os genes *pknS* e o sigma *ecfK* que fazem parte do cluster 1 do SSVI e que segundo modelo proposto neste trabalho, estão antes de *tagK* na via de regulação do SSVI.

CLUSTER 1



CLUSTER 2

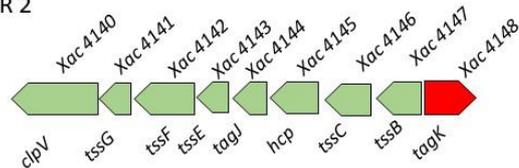


Figura 20- TagK regula positivamente os genes do SSVI. Figura esquemática da organização genômica dos dois clusters que compõem o SSVI de *X. citri*. Em verde são os genes que estão presentes no regulon de *tagK* e, em vermelho, o gene *tagK*.

Além dos genes já citados, o fator sigma *ecfL* também não está presente no *regulon* de *tagK*, assim como o anti-sigma *fecR*. Dados do nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado que *ecfL* não é importante para a predação pela ameba *D. discoideum* (PEREIRA, 2019).

Também analisamos o transcriptoma da linhagem $\Delta ecfK$ superexpressando *tagK* ($\Delta ecfK tagK$) comparada a linhagem WT. O gene *ecfK* apresentou expressão reduzida, dado esperado já que a linhagem utilizada possuía deleção do gene *ecfK*. Além disso, os 25 genes presentes no *regulon* de *tagK* foram positivamente regulados, confirmando os dados de placa de fagocitose (Figura 12) e qRT-PCR (Figura 14 e 15), que indicaram que a superexpressão de *tagK* foi suficiente para aumentar a expressão dos genes do SSVI de *X. citri*. Quando foi analisada a linhagem $\Delta ecfK tagK$ comparada a linhagem WT *tagK* o único gene regulado negativamente foi o *ecfK*, não tendo sido identificado nenhum outro gene com expressão diferencial.

5. DISCUSSÃO

TagK é um fator de transcrição da família AraC/ XylS presente no *regulon* do fator sigma EcfK (LIMA, 2017). Com as análises de homologia apresentadas, observou-se que homólogos de *tagK* estão próximos ao contexto genômico de homólogos de *ecfK* e *pknS* indicando a atuação desses genes em conjunto mesmo quando o SSVI não está presente. Com esses dados podemos supor que o SSVI do tipo 3* foi adquirido por uma inserção ou até mesmo que as linhagens que possuem homólogos de *tagK* e *ecfK* e que não possuem SSVI, sofreram um evento de perda do sistema.

Analisando a homologia de TagK com outros FTs da mesma família já caracterizados, foi possível observar que resíduos importantes para a ligação da proteína ao promotor (S40, R96) e para manter a estrutura terciária (L44, F48, L72, F98, P106) são conservados, indicando uma possível similaridade entre o modo de regulação de TagK e outras proteínas da mesma família.

Nos dados experimentais apresentados neste trabalho demonstramos que a superexpressão do fator de transcrição TagK promove aumento dos níveis de RNAm e das proteínas do SSVI e que as linhagens que tiveram *tagK* deletado são mais suscetíveis a predação do que a linhagem selvagem. Ainda, foi demonstrado que *tagK* é capaz de restaurar o fenótipo selvagem nas linhagens que não possuem *ecfK*, ou seja, na ausência de *ecfK*, TagK é suficiente para aumentar a transcrição e a quantidade de proteínas do SSVI de *X. citri*.

Além disso, foi demonstrado que apesar de um aumento de RNAm de genes essenciais do SSVI (3,06 vezes *clpV* e 3,22 vezes de *vgrG*, com erros de 0,94 e 0,79 respectivamente) na linhagem $\Delta tagK$ *ecfK* T51E em contato com *D. discoideum* (Figura 16), este aumento está muito próximo ao limite de duas vezes, considerado para determinar uma expressão diferencial, além disso, o aumento não foi suficiente para complementar o fenótipo selvagem, nas linhagens sem *tagK* pois a superexpressão do sigma ativo não é capaz de aumentar as proteínas do SSVI de *X. citri*.

No genoma de *X. citri* é possível encontrar 15 proteínas classificadas como pertencentes a família AraC/ XylS, mas somente uma delas foi caracterizada na literatura. HrpX está envolvido na ativação do SSIII, essencial para a virulência desta bactéria. As características de TagK e HrpX podem indicar que fatores de transcrição da família AraC/ XylS podem ser importantes reguladores dos sistemas de secreção e que o estudo destes podem auxiliar na compreensão de como esses sistemas atuam e são regulados.

A partir dos dados obtidos, propusemos um modelo de regulação da expressão do SSVI de *X. citri*, esquematizado na Figura 21. Assim, quando a bactéria recebe um sinal para que o SSVI fique ativo, desencadeado pela presença de predadores eucarióticos, o sigma EcfK é ativado e se liga ao cerne da RNA polimerase e induz o promotor do fator de transcrição *tagK*. A proteína TagK então induz os promotores dos genes do SSVI, aumentando a transcrição e quantidade das proteínas.

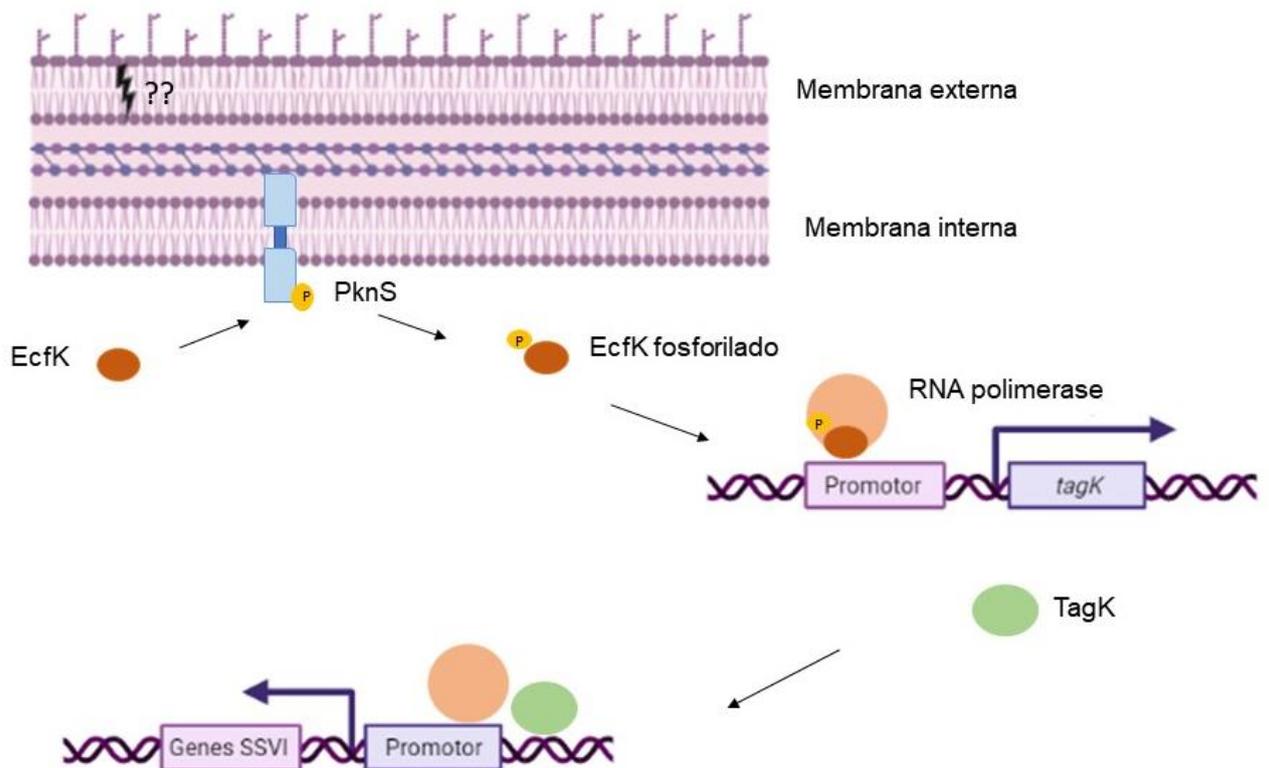


Figura 21- Modelo proposto para regulação do SSVI de *X. citri* EcfK é fosforilado por PknS e após a fosforilação ativa a transcrição de *tagK*. TagK ativa a transcrição de genes do SSVI e do SSV inserido no agrupamento genômico do SSVI.

Além de propor um modelo de regulação para o SSVI de *X. citri*, este trabalho descreve também o conjunto de genes presentes no *regulon* de *tagK*. TagK regula todos os genes do SSVI. No entanto, é importante destacar que, inserido no contexto genômico do SSVI, temos um SSV (*yapH; shlB*) (Figura 2) que também é regulado positivamente por TagK. Ainda é importante observar que os dados experimentais mostraram que a superexpressão de *tagK* promove acúmulo das proteínas Hcp e PAAR. No entanto, elas não foram secretadas *in vitro*

nas condições analisadas (CESETI, L, dados não publicados). Um dos genes presentes no regulon de *tagK* que podem estar associados ao acúmulo de proteínas observado nas linhagens superexpressando *tagK*, mas não naquelas superexpressando *ecfK* (CESETI, L, dados não publicados) é o *tssA*, já que ele não está presente no regulon de *ecfK* (LIMA, 2017). Estudos realizados em *E.coli* demonstraram que TssA é importante para no recrutamento inicial das proteínas para que o SSVI seja montado, ou seja em *E. coli* TssA é responsável por recrutar VgrG e TssE, para que a base do SSVI seja montada e assim a polimerização do tubo ocorra (ZOUED et al., 2016). Portanto, sugere-se que para que ocorra o acúmulo de proteínas do SSVI em *X. citri* é necessário que *tssA* seja expresso, no entanto, ainda não foi possível determinar se somente a ativação de *tssA* é capaz de induzir a montagem correta do SSVI na membrana da bactéria e qual é o sinal capaz de promover a secreção das proteínas.

Os SSV são normalmente compostos de uma ou duas proteínas localizadas na membrana externa das bactérias Gram negativas, não requerindo gasto de ATP para o funcionamento. O gene *yapH* já foi identificado em *Xanthomonas* sp como um dos genes responsáveis por codificar adesinas não fimbriais, que são importantes nas primeiras etapas de interação da bactéria com o hospedeiro (DARSONVAL et al., 2009); (MHEDBI-HAJRI et al., 2011)(ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2021). Uma das hipóteses é que, para que a secreção das proteínas ocorra *in vitro*, é necessário a ativação das proteínas do SSV. Ou seja, é necessário que as adesinas não fimbriais sejam ativadas, provavelmente pelo contato com um organismo competidor, assim as proteínas acumuladas pela indução de *tagK* serão secretadas para o meio externo.

Apesar do nosso estudo ter esclarecido como *tagK* atua na ativação dos genes do SSVI, ainda é necessário elucidar quais são os sinais que ativam *ecfK* e o que é necessário para que as proteínas do SSVI sejam secretadas. Uma das possíveis análises experimentais para a validação da hipótese apresentada seria a construção de linhagens com o SSV constitutivamente ativo superexpressando *tagK*. No entanto, é importante destacar que essa conformação genética pode ser energeticamente muito custosa para a bactéria e inviabilizar seu desenvolvimento.

Os dados experimentais e discussões realizados neste estudo demonstram a grande importância biológica do estudo de reguladores como os fatores de transcrição da família AraC/XylS de *X. citri*, uma família de reguladores ausente em organismos eucarióticos, o que os torna excelentes alvos para o desenvolvimento de moléculas antivirulência (CORBELLA et al., 2021; SHRESTHA et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

São poucos os estudos científicos já publicados que elucidam os mecanismos de regulação do SSVI em *X. citri* e em outros organismos que possam ser utilizados como modelo. A pesquisa desenvolvida neste trabalho possibilitou uma maior compreensão de como o fator de transcrição TagK está envolvido na regulação do SSVI de *X. citri*. Os dados sugerem que:

- TagK não possui o domínio de ligação ao ligante e o domínio de ligação ao DNA no mesmo polipeptídeo;
- EcfK ativa a transcrição do fator de transcrição TagK em resposta ao contato com *D. discoideum*;
- TagK ativa a transcrição dos genes do SSVI de *X. citri*;
- *tagK* é suficiente para restaurar o fenótipo selvagem das linhagens que não possuem o sigma *ecfK*;
- a superexpressão de *tagK* aumenta os níveis de proteínas do SSVI
- e o *regulon* de TagK é composto de 25 genes e inclui todos os genes que compõe o SSVI e o SSV inserido no agrupamento genômico do SSVI de *X. citri*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-MARTINEZ, C. E. et al. Secrete or perish : The role of secretion systems in Xanthomonas biology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 279–302, 2021.

AN, S. Q. et al. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, p. 1–32, 2019.

BALLEZA, E. et al. Regulation by transcription factors in bacteria: Beyond description. **FEMS Microbiology Reviews**, 2009.

BANSAL, K.; KUMAR, S.; PATIL, P. B. Phylogenomic Insights into Diversity and Evolution of Nonpathogenic Xanthomonas Strains Associated with Citrus. **mSphere**, v. 5, n. 2, p. e00087-20, 2020.

BASLER, M. et al. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. **Nature**, v. 483, n. 7388, p. 182–186, 2012.

BAYER-SANTOS, E. et al. Xanthomonas citri T6SS mediates resistance to Dictyostelium predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1562–1575, 2018.

BAYER-SANTOS, E. et al. Distribution, function and regulation of type 6 secretion systems of Xanthomonadales. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, p. 1–10, 2019.

BEHLAU, F.; BELASQUE, J. Cancro cítrico: a doença e seu controle. **Araraquara, Brazil: Fundecitrus**, 2014.

BOYER, F. et al. 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**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2009.

BROWNING, Douglas F.; BUSBY, Stephen JW. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 57-65, 2004.

BROWNING, Douglas F.; BUSBY, Stephen JW. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 638-650, 2016.

BRUNET, Yannick R. et al. The type VI secretion TssEFGK-VgrG phage-like baseplate is recruited to the TssJLM membrane complex via multiple contacts and serves as assembly platform for tail tube/sheath polymerization. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 10, p. e1005545, 2015.

BRUNINGS, Asha M.; GABRIEL, Dean W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107–133, 2010.

CESETI, L. M. et al. The *Xanthomonas citri* pv. *citri* Type VI Secretion System is Induced During Epiphytic Colonization of Citrus. **Current Microbiology**, v. 76, n. 10, p. 1105–1111, 2019.

CIANFANELLI, F. R. et al. VgrG and PAAR Proteins Define Distinct Versions of a Functional Type VI Secretion System. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. 1–27, 2016.

CIANFANELLI, F. R.; MONLEZUN, L.; COULTHURST, S. J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 51–62, 2016.

COHEN, S. P.; MCMURRY, L. M.; LEVY, S. B. *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 12, p. 5416-5422, 1988.

CORBELLA, M. et al. The N-terminal Helix-Turn-Helix Motif of Transcription Factors MarA and Rob Drives DNA Recognition. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2021.

COSTA, T. R. D. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 343–359, 2015.

DE DIOS, R.; SANTERO, E.; REYES-RAMÍREZ, F. Extracytoplasmic function σ factors as tools for coordinating stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, 2021.

DARSONVAL, Arnaud et al. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 6, p. 747-757, 2009.

DUNGER, G. et al. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 2, p. 127–135, 2007.

DURAND, ERIC. et al. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 9, p. 498-507, 2014.

DUVAL, V.; M, L. I. MarA, SoxS and Rob of *Escherichia coli* – Global Regulators of Multidrug Resistance, Virulence and Stress Response. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 2, n. 3, p. 101–124, 2013.

FIGUEIREDO, J. F. L. et al. Mutational analysis of type III effector genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, n. 3, p. 339–347, 2011.

FROQUET, R. et al. *Dictyostelium discoideum*: A model host to measure bacterial virulence. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 25–30, 2009.

FUNDECITRUS. **Reestimativa da safra de laranja de 2020/21 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/ sudoeste mineiro– Fechamento em abril/2021**. Disponível em:https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0421_Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf. Acesso em: 14 Jun. 2021.

GALLEGOS, M. T. et al. Arac/XylS family of transcriptional regulators. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 61, n. 4, p. 393–410, 1997.

GAO, WEIMIN. et al. 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**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2006.

GAUDU, P.; MOON, N.; WEISS, B. Regulation of the soxRS oxidative stress regulon: Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 8, p. 5082–5086, 1997.

GILLETTE, W. K.; MARTIN, R. G.; ROSNER, J. L. Probing the *Escherichia coli* transcriptional activator MarA using alanine-scanning mutagenesis: Residues important for DNA binding and activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, n. 5, p. 1245–1255, 2000.

GRIFFITH, K. L.; SHAH, I. M.; WOLF, R. E. Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1801–1816, 2004.

GRIFFITH, K. L.; WOLF, R. E. A comprehensive alanine scanning mutagenesis of the *Escherichia coli* transcriptional activator SoxS: Identifying amino acids important for DNA binding and transcription activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 2, p. 237–257, 2002.

GUO, Y. et al. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 649–661, 2011.

GUZMAN, L. M. et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4121–4130, 1995.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.

IYER, S. C. et al. Transcriptional regulation by σ factor phosphorylation in bacteria. **Nature microbiology**, v. 5, n. 3, p. 395-406, 2020.

JACQUES, M. A. et al. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 54, p. 163–187, 2016.

JAIN, K.; SAINI, S. MarRA, SoxSR, and Rob encode a signal dependent regulatory network in: *Escherichia coli*. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 6, p. 1901–1912, 2016.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KOEBNIK, R. et al. Specific Binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-Type Transcriptional Activator HrpX to Plant-Inducible Promoter Boxes. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 21, p. 7652–7660, 2006.

KWON, H. J. et al. Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. **Nature structural biology**, v. 7, n. 5, p. 424-430, 2000.

LEE, D. J.; MINCHIN, S. D.; BUSBY, S. J. W. Activating transcription in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. June, p. 125–152, 2012.

LIMA, L. P. **Caracterização de fator sigma de função extracitoplasmática SigF de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Universidade Estadual de Campinas, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MARTIN, R. G.; ROSNER, J. L. **The AraC transcriptional activators** **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 132-137, 2001.

MARTÍNEZ-ANTONIO, A.; COLLADO-VIDES, J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 5,

p. 482–489, 2003.

MARTÍNEZ-NÚÑEZ, Mario Alberto; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Katya; PÉREZ-RUEDA, Ernesto. The lifestyle of prokaryotic organisms influences the repertoire of promiscuous enzymes. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 83, n. 9, p. 1625-1631, 2015.

MASCHER, T. Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) σ factors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 148–155, 2013.

MHEDBI-HAJRI, Nadia et al. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

MONTENEGRO BENAVIDES, N. A. et al. The type VI secretion system of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* is involved in virulence and in vitro motility. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2021.

MOUGOUS, J. D. et al. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 797–803, 2007.

OKUSU, H.; MA, D. AcrAB Efflux Pump Plays a Major Role in the Antibiotic Resistance Phenotype of *Escherichia coli* Multiple- Antibiotic-Resistance (Mar) Mutants. **Journal of bacteriology** v. 178, n. 1, p. 306–308, 1996.

PEREIRA, J. B. Caracterização do Fator Sigma Extracitoplasmático EcfL de *Xanthomonas citri* pv . *citri* Characterization of the Extracytoplasmatic Sigma Factor EcfL from *Xanthomonas citri* pv . *citri*. p. 1–79, 2019.

PEREZ-RUEDA, E. et al. Abundance, diversity and domain architecture variability in prokaryotic DNA-binding transcription factors. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–16, 2018.

POPLAWSKY, A. R.; URBAN, S. C.; CHUN, W. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5123–5127, 2000.

PUKATZKI, S. et al. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 39, p. 15508–15513, 2007.

RIED, J. L.; COLLMER, A. An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. **Gene**, v. 57, n. 2–3, p. 239–246, 1987.

ROSNER, Judah L. et al. Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyriddy in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 5, p. 1407-1416, 2002.

RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: Understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SCHLEIF, R. AraC protein: A love-hate relationship. **BioEssays**, v. 25, n. 3, p. 274–282, 2003.

SCHLEIF, Robert. Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. **Trends in genetics**, v. 16, n. 12, p. 559-565, 2000.

SCHLEIF, R. AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 5, p. 779–796, 2010.

SHALOM, G.; SHAW, J. G.; THOMAS, M. S. In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2689–2699, 2007.

SHNEIDER, Mikhail M. et al. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 350-353, 2013.

SHRESTHA, M. et al. Structural analysis of the regulatory domain of ExsA, a key transcriptional regulator of the type three secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–17, 2015.

SILVA, A. C. R. et al. Genome Xac - Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002.

SILVERMAN, J. M. et al. Haemolysin Coregulated Protein Is an Exported Receptor and Chaperone of Type VI Secretion Substrates. **Molecular Cell**, v. 51, n. 5, p. 584–593, 2013.

STARONĆ, A. et al. The third pillar of bacterial signal transduction: Classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 557–581, 2009.

WATTS, D. J.; ASHWORTH, J. M. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. **The Biochemical journal**, v. 119, n. 2, p. 171–174, 1970.

WEBER, B. S. et al. Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, TagX, required for its biogenesis. **mBio**, v. 7, n. 5, 2016

ZHU, P. C. et al. Type VI secretion system is not required for virulence on rice but for inter-bacterial competition in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Research in Microbiology**, v. 171, n. 2, p. 64–73, 2020

ZOUED, A. et al. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1664–1673, 2014.

8. ANEXOS

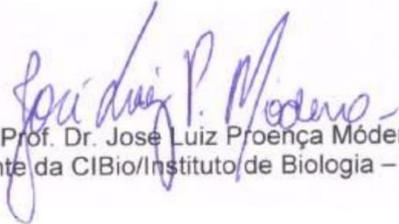
Aprovação do Projeto junto ao CIBio/ IB



INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto **CIBio/IB No. 2014/3 – “O Sistema de Secreção do tipo VI de *Xanthomonas citri* pv *citri*: função, regulação e substratos secretados**”, cujo pesquisador responsável é a Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez, sub-projeto “Análise do efeito do regulador transcricional tagK na regulação do Sistema de Secreção do tipo VI de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*”, do pós-graduando Eliane Silva de Santana, RA 135544, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,
20 de outubro de 2020.



Prof. Dr. Jose Luiz Proença Modena
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 **ANÁLISE DO EFEITO DO REGULADOR TRANSCRICIONAL TagK NA REGULAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 01 de Fevereiro de 2022

Assinatura : *Eliane S de Santana*
Nome do(a) autor(a): **Eliane Silva de Santana**
RG n.º 34631228-0

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