Identificação de Proteínas Secretadas pelo Sistema de Secreção tipo VI de *Xanthomonas citri* por ensaios de duplo híbrido em leveduras.

Gabriel Theizen Novaes*, Lucas de Moraes Ceseti, Cristina Elisa Alvarez-Martinez

Resumo

Xanthomonas citri é um importante fitopatógeno de plantas do gênero citrus que leva a grandes perdas nas plantações brasileiras. Recentemente nosso grupo de pesquisa caracterizou a sua resistência à ameba de solo *Dictyostelium discoideum* e atribuiu este feito ao Sistema de Secreção tipo seis (SSVI), sendo tal fenótipo essencial para a sua persistência e disseminação no meio ambiente. Assim, identificar as proteínas secretadas pela bactéria que garantam esta resistência é fundamental para a compreensão do avanço desta pelo ambiente. Para isso, utilizamos a metodologia de duplo híbrido em leveduras que busca identificar interações entre proteínas, permitindo que possamos identificar as proteínas que interajam com os componentes estruturais do SSVI que são responsáveis por secretar tais proteínas que garantam o fenótipo de resistência. Ao presente momento, identificamos 10 proteínas interagindo com a proteína PAAR e 2 proteínas interagindo com a proteína VgrG, sendo necessário sequenciar estas proteínas para compará-las a um banco de dados e identificá-las.

Palavras-chave:

Xanthomonas citri, efetores, duplo híbrido

Introdução

Sistemas de secreção do tipo VI são maquinarias de transporte de proteínas para células-alvo, que atuam em diversos aspectos da fisiologia bacteriana, incluindo virulência e competição com micro-organismos no ambiente (1). O sistema de secreção tipo seis (SSVI) de *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*X. citri*) é essencial para a resistência da bactéria à ameba de solo *Dictyostelium discoideum* (2). *X. citri* é um importante fitopatógeno, que causa a doença cancro cítrico em todos os cultivares de citros importantes na atividade agrícola brasileira. Assim, é importante identificar os mecanismos moleculares de atuação do SSVI e as proteínas por ele secretadas (efetores), que conferem o fenótipo de resistência. O presente trabalho tem por objetivo identificar proteínas que interagem com os componentes do SSVI PAAR e VgrG, proteínas responsáveis pelo recrutamento de efetores para secreção. Para isso, utilizamos a metodologia de duplo híbrido em leveduras, buscando-se detectar interações de proteínas codificadas por biblioteca genômica de *X. citri* com as proteínas estruturais do SSVI VgrG e PAAR (denominada iscas). Paralelamente, estamos realizando testes de interação direta entre duas proteínas que são fortes candidatas a efetores com PAAR e VgrG.

Resultados e Discussão

Interações positivas foram obtidas em ensaios de duplo híbrido com biblioteca genômica de *X. citri* usando-se as proteínas VgrG e PAAR como iscas e o projeto encontra-se atualmente em fase de identificação destas interações por sequenciamento dos clones positivos.

Tabela 1. Genes testados e quantidades de colônias com interação positiva encontrada

GENE	COLONIAS TESTADAS	COLONIAS POSITIVAS
PAAR	370	10
VgrG	70	2

Conclusões

O presente projeto encontra-se em fase de obtenção de resultados, sendo necessário concluir o sequenciamento das colônias positivas para interação com as proteínas VgrG e PAAR para, por fim, identificar a proteína que esteja possivelmente sendo secretada pelo SSVI de *Xanthomonas citri*.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Laboratório de Genética Bacteriana.

1. Lien Y-W, Lai E-M. Type VI Secretion Effectors: Methodologies and Biology. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017;7(June):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00254/full>

2. Bayer-Santos E, Lima L dos P, Ceseti L de M, Ratagami CY, de Santana ES, da Silva AM, et al. *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environ Microbiol* [Internet]. 2018;00. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.14085>