



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Estudio de proteínas efectoras y proteínas regulatorias del sistema de secreción tipo tres del fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*”

Presentada por

Lic. Cecilia Graciela Garofalo

Rosario, Argentina

2012

“Estudio de proteínas efectoras y proteínas regulatorias del sistema de secreción tipo tres del fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*”

Cecilia Graciela Garofalo

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET) y en el Area Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), durante el período comprendido entre el mes de agosto de 2008 y el mes de diciembre de 2012, bajo la dirección de la Dra. Jorgelina Ottado.

Agradecimientos

Agradezco a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) y todo su personal por mi formación académica de grado y posgrado; al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas doctorales otorgadas; a la Fundación Josefina Prats por el premio recibido; y al Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), por la infraestructura y el equipamiento que fueron claves para el desarrollo experimental del presente trabajo. Todos, desde los alcances y posibilidades de cada institución, apoyaron este trabajo de tesis. Especialmente al IBR y todos sus integrantes que siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos y aportar sugerencias.

Agradezco a la Dra. Jorgelina Ottado por la dirección de este trabajo de tesis y permitirme formar parte de un hermoso grupo de trabajo que junto con la Dra. Natalia Gottig, colaboraron en mi formación académica y personal.

A mis tutoras de tesis, Dra. Beatriz Farruggia y Dra. Estela Valle, por el seguimiento de mi trabajo y la buena predisposición que tuvieron siempre.

A mis compañeros de laboratorio durante estos años de tesis, Betiana G., Germán S., Tamara Z. y Florencia F., que en distintos espacios físicos supimos adaptarnos y crear un ambiente de trabajo ameno y lleno de anécdotas. A Claudia G. porque además de su colaboración profesional ofició muchas veces de amiga distendiendo las preocupaciones diarias con un poquito de música y charlas agradables.

A todos los integrantes de la cátedra de Biofísica, especialmente al Dr. Oscar Roveri. Todos son parte de mi formación como docente y de mi formación biofísica que continua enriqueciéndose día a día. Especialmente a Ana B. y Anabella L. que me acompañaron durante los primeros años en la cátedra.

A Guillermo B., Susana C., Bibiana L., Mónica G., José R. C., Josefina C., Marcelo M., Andrea V. y Celia. Desde sus profesiones y desde lo más profundo de sus corazones todos ellos cuidan mi cuerpo y alma desde hace unos años. Les agradezco todo el apoyo, la fuerza y la confianza que me dieron para superar momentos difíciles pero no imposibles.

A mis amigos y vecinos, que me brindan su cariño, sus palabras y su sincera compañía todos los días.

Por último, y no por ello menos importante, mis mayores agradecimientos y reconocimientos son para mis padres. Gracias por el amor, por la paciencia y el sacrificio, y por incentivar siempre mis estudios. Por ser tan buenas personas y desear siempre lo mejor para mí. A mi hermana Andrea porque a pesar de las diferencias es mi mejor amiga y compañera de vida, porque conoce mis defectos y virtudes pero siempre me alienta a seguir adelante. A todos mis familiares “de sangre” y “políticos” por el cariño y el apoyo que le dieron a esta biotecnóloga loca que tienen en la familia!!! A Mariano, porque te elegí para compartir mi vida, porque cuando estoy con vos encuentro paz y felicidad, porque te amo. A Dios por el mejor regalo del mundo: mi VIDA.

¡Muchas Gracias a todos!

*“Le pedí a Dios Todo para gozar la Vida,
El me dio Vida para gozarlo Todo.”*

A mis padres

Algunos resultados de este trabajo de tesis han sido publicados en:

Revistas científicas:

Dunger G, Garofalo CG, Gottig N, Garavaglia BS, Pereda Rosa MC, Farah CS, Orellano EG y Ottado J (2012). "Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins." Mol Plant Pathol. 13:865-876.

Reuniones científicas:

Garofalo CG, Ottado J, Gottig N. "Regulación del cluster *hrp* mediado por HrpG en *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*". XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Organizado por SBR. Rosario, Argentina (Diciembre, 2011).

Garofalo CG, Ottado J, Gottig N. "Estudio de proteínas regulatorias del sistema de secreción tipo tres del fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*". V Jornada de Ciencia y Tecnología, UNR. Organizado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología, UNR. Rosario, Argentina (Noviembre, 2011).

Garofalo CG, Dunger G, Gottig N, Garavaglia BS, Orellano EG, Ottado J. "Proteínas efectoras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y su rol en la patogenicidad". XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, organizado por la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal (AAFV). La Plata, Argentina (Septiembre, 2010).

Indice general

Indice general	I
Indice de figuras	V
Indice de tablas	VII
Abreviaturas y Símbolos	VIII
Anglicismos y Lenguaje especial	X
1. INTRODUCCION	1
1.1-Interacción planta-patógeno	1
1.1.1-Resistencia no hospedadora	3
1.1.2-Resistencia hospedadora	4
1.2-Mecanismos de defensa de las plantas	4
1.2.1-Respuesta hipersensible	5
1.2.2-Inmunidad innata o inmunidad inducida por PAMPs	6
1.2.3-Inmunidad inducida por proteínas efectoras	8
1.3-Mecanismos de interacción entre proteínas efectoras y proteínas de resistencia	9
1.3.1-Modelo de gen por gen o de receptor-ligando	10
1.3.2-Modelo o Hipótesis de la guarda	10
1.3.3-Proteínas efectoras	13
1.3.4-Proteínas de resistencia	14
1.4-Cancrosis de los cítricos	17
1.4.1-Características del género <i>Xanthomonas</i>	17
1.4.2-Epidemiología y características principales de la enfermedad	18
1.4.3-Síntomas de la enfermedad y ciclo de vida del patógeno	20
1.5-<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>. Características principales	22
1.6-Sistema de secreción de proteínas tipo III	29
1.6.1-Características generales	29
1.6.2-Cluster génico <i>hrp</i> en bacterias fitopatógenas	30
1.6.3-Estructura de la maquinaria de secreción	33
1.6.4-Regulación del cluster <i>hrp</i> en <i>Xanthomonas</i>	37
2. OBJETIVOS	41
2.1-Objetivos generales	41
2.2-Objetivos específicos	41
3. MATERIALES Y METODOS	42
3.1-Cultivos bacterianos y vectores	42
3.1.1-Cepas	42
3.1.2-Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	44
3.1.3-Vectores	44
3.2-Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos	46
3.2.1-Técnicas de ADN recombinante	46
3.2.2-Oligonucleótidos	47
3.2.3-Preparación de ADN genómico de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	48
3.3-Mutagénesis de genes de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	49
3.3.1-Conjugación bacteriana	49

3.3.2-Construcción de cepas mutantes en genes de proteínas efectoras	50
3.3.3-Complementación de cepas mutantes en genes de proteínas efectoras	50
3.3.4-Construcción de cepas sobreexpresantes del regulador HrpG	51
3.3.5-Construcción de la cepa mutante en el gen <i>hrpG</i>	52
3.3.6-Complementación de la cepa mutante en el gen <i>hrpG</i>	52
3.4-Expresión y purificación de proteínas recombinantes	53
3.4.1-Clonado de las secuencias codificantes de las proteínas HrpG y R210C de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> en vectores de expresión	53
3.4.2-Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en cepas de <i>E. coli</i>	53
3.4.3-Obtención de los extractos proteicos	54
3.4.4-Purificación de las proteínas recombinantes	54
3.5-Métodos analíticos	55
3.5.1-Cuantificación de proteínas	55
3.5.2-Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	55
3.5.3-Western-blot: electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa	56
3.5.4-Western-blot: inmunodetección y revelado por colorimetría	56
3.6-Expresión y localización in planta de las proteínas efectoras de Xac	57
3.6.1-Construcción de los vectores de expresión de las proteínas efectoras de Xac fusionadas a la proteína fluorescente verde GFP	57
3.6.2-Agroinfiltración	57
3.6.3-Localización <i>in planta</i> de las proteínas de fusión a GFP	58
3.7-Cultivos de plantas	58
3.8-Inoculación de hojas por el método de presión	58
3.9-Curva de crecimiento bacteriano in planta	59
3.10-Cuantificación de áreas de necrosis en los tejidos vegetales infectados	59
3.11-Determinación de parámetros fotosintéticos y pigmentos	60
3.11.1-Medidas de extinción de la fluorescencia de clorofilas	60
3.11.2-Determinación de pigmentos vegetales	61
3.12-Ensayos microbiológicos en medios de cultivo sólidos	61
3.12.1-Determinación de la secreción de proteasas	61
3.12.2-Determinación de la secreción de amilasas	62
3.12.3-Determinación de la secreción de celulasas	62
3.13-Ensayos de movilidad bacteriana	62
3.14-Análisis de proteínas flagelares	63
3.15-Análisis transcripcional	63
3.15.1-Obtención de ARN bacteriano con TRIzol®	63
3.15.2-Obtención de ARN bacteriano a partir de hojas infectadas	63
3.15.3-Reacción de retrotranscripción	64
3.15.4-Reacción de amplificación por PCR	64
3.16-Ensayos de activación transcripcional mediante el gen reportero <i>gfp</i>	64
3.16.1-Clonado de las secuencias promotoras en el vector reportero	64
3.16.2-Determinación de la activación transcripcional mediante fluorescencia	65
3.17-Ensayos de retardo en gel de la movilidad electroforética	65
3.17.1-Clonado de las secuencias promotoras de los genes <i>hrpG</i> y <i>hrpX</i>	65
3.17.2-Reacción de marcación y fosforilación de oligonucleótidos con [γ - ³² P]ATP	66
3.17.3-Obtención de la sonda promotora marcada radiactivamente	66

3.17.4-Reacción de unión ADN-proteína, electroforesis en gel de poliacrilamida y revelado.	67
3.17.5-Determinación de las constantes de equilibrio Kd	68
3.18-Métodos bioinformáticos	68
3.19-Análisis de datos	70
3.19.1-Procesamiento de las imágenes	70
3.19.2-Cuantificación de las bandas	70
3.19.3-Análisis estadístico	70

RESULTADOS Y DISCUSION

4. CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EFECTORAS DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI	71
4.1-Introducción y Antecedentes	71
4.1.1-Proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090. Características	71
4.1.2-Identificación de proteínas de naranja que interaccionaron con las proteínas AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 en un ensayo de interacción proteína-proteína	72
4.1.3-Construcción de cepas de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> mutantes en las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090	73
4.2-Complementación de cepas mutantes de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> en las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090	74
4.3-Construcción de una cepa doble mutante de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> en las proteínas efectoras AvrXacE1 y AvrXacE2	75
4.4-Characterización de las cepas mutantes de Xac en las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 durante la cancrrosis de los cítricos	76
4.4.1-Inoculación de plantas de naranja con cultivos bacterianos	76
4.4.2-Cuantificación de las áreas de necrosis en los tejidos vegetales infectados	78
4.4.3-Análisis del crecimiento bacteriano <i>in planta</i>	79
4.5-Characterización de las cepas mutantes en las proteínas efectoras de Xac en la inducción de respuesta hipersensible en plantas no hospedadoras	80
4.6-Localización subcelular de las proteínas efectoras bacterianas AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 en células vegetales	81
4.7-Análisis del rol de la proteína Xac3090 en la eficiencia fotosintética de cloroplastos	84
4.7.1-Determinación del contenido de pigmentos	84
4.7.2-Determinación de parámetros fotosintéticos	84
4.8-Discusión	87
5. CAPITULO II: PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA REGULATIVA HRP G EN LA VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI	92
5.1-Introducción	92
5.2-Construcción de una cepa de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> sobreexpresante del gen <i>hrpG</i>	93
5.3-Construcción de una cepa mutante de <i>X. axonopodis</i> pv <i>citri</i> en el gen <i>hrpG</i>	98

5.4-Complementación génica de la cepa mutante XacΔhrpG	99
5.5-Characterización de las cepas sobreexpresantes XacHrpG y XacR210C, la cepa mutante XacΔhrpG y las cepas complementadas, en la cancrrosis de los cítricos	101
5.5.1-Inoculación de plantas de naranja con cultivos bacterianos	101
5.5.2-Análisis del crecimiento bacteriano <i>in planta</i>	102
5.6-Characterización de las cepas de Xac construidas en la inducción de respuesta hipersensible en plantas no hospedadoras	104
5.7-Characterización mediante ensayos microbiológicos de las cepas construidas de Xac en relación con el regulador HrpG	105
5.7.1-Secreción de proteasas	106
5.7.2-Secreción de amilasas	108
5.7.3-Secreción de celulasas	108
5.8-Estudio de la movilidad bacteriana en las cepas construidas de Xac	109
5.9-Análisis de la expresión génica en las cepas construidas de Xac	111
5.9.1-Expresión génica en medio de cultivo rico y en medio mínimo XVM2	111
5.9.2-Expresión génica <i>in planta</i> de XacHrpG y XacR210C	113
5.10-Discusión	115
6. CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROTEÍNA REGULATIVA HRP G DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI	126
6.1-Introducción	126
6.2-Identificación de regiones promotoras de genes regulados por HrpG	126
6.2.1-Participación de HrpG en la regulación transcripcional del cluster <i>hrp</i>	126
6.2.2-Selección y análisis <i>in silico</i> de secuencias promotoras	128
6.2.3-Estudio de la funcionalidad de las secuencias promotoras	131
6.3-Characterización de la interacción del regulador HrpG y el regulador mutante R210C con las regiones promotoras de los genes <i>hrpX</i> y <i>hrpG</i>	132
6.3.1-Clonado, expresión y purificación de HrpG y R210C como proteínas de fusión	132
6.3.2-Obtención de las sondas promotoras marcadas radiactivamente	136
6.3.3-Optimización de las condiciones de reacción para los ensayos de interacción ADN-proteína	136
6.3.4-HrpG y R210C interaccionan con las regiones promotoras de <i>hrpX</i> y <i>hrpG</i>	138
6.3.4.1-Ensayos de variación de la concentración de proteína	138
6.3.4.2-Ensayos de competencia	141
6.4-Identificación de dominios conservados en HrpG de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	143
6.4.1-Modelado estructural de HrpG	143
6.4.2-Modelado estructural del extremo C-terminal de HrpG	145
6.4.3-Modelo de unión al ADN de HrpG y el rol del residuo de arginina 210	148
6.5-Discusión	151
7. CONCLUSIONES	160
8. RESUMEN	164
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	166

Índice de figuras

Figura 1.1. Modelo evolutivo de las interacciones planta-patógeno. Inmunidad PTI y ETI.	7
Figura 1.2. Clasificación de proteínas de resistencia.	15
Figura 1.3. Ciclo de vida de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> en la cancrrosis de los cítricos.	21
Figura 1.4. Síntomas de la cancrrosis de los cítricos.	22
Figura 1.5. Características principales de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .	24
Figura 1.6. Cluster <i>hrp</i> en <i>Xanthomonas</i> .	32
Figura 1.7. Estructura y componentes principales de la maquinaria del SSTT.	35
Figura 1.8. Modelo de regulación del cluster <i>hrp</i> .	39
Figura 4.1. Representación esquemática de las proteínas efectoras de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .	72
Figura 4.2. Complementación de las cepas mutantes de Xac en los genes <i>avrXacE1</i> , <i>avrXacE2</i> y <i>xac3090</i> .	75
Figura 4.3. Verificación de la construcción de la cepa doble mutante Xac Δ avrXacE1/E2 mediante PCR.	76
Figura 4.4. Patogenicidad de las cepas mutantes de Xac en las proteínas efectoras.	77
Figura 4.5. Porcentaje del área necrótica en lesiones producidas por las cepas de Xac.	78
Figura 4.6. Curvas de crecimiento bacteriano en hojas de naranja.	80
Figura 4.7. Respuesta HR producida en hojas de plantas no hospedadoras por las cepas de Xac mutantes en los genes efectoras.	81
Figura 4.8. Detección y localización subcelular de las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 fusionadas a GFP.	82
Figura 4.9. Localización en cloroplastos de la proteína Xac3090-GFP.	83
Figura 4.10. Determinación del contenido de pigmentos en hojas de naranja inoculadas con Xac salvaje (Xacwt) y Xac Δ xac3090.	84
Figura 4.11. Determinación de parámetros fotosintéticos.	85
Figura 5.1. Inoculación de cepas transconjugantes de Xac.	94
Figura 5.2. Esquema representativo de la proteína HrpG.	95
Figura 5.3. Alineamientos de secuencias entre HrpG y proteínas homólogas.	96
Figura 5.4. Inoculación de cepas transconjugantes de Xac conteniendo la nueva construcción pBBR1MCS-3-HrpG.	98
Figura 5.5. Construcción y complementación de la cepa mutante Xac Δ hrpG.	100
Figura 5.6. Patogenicidad en hojas de naranja de las cepas sobreexpresantes XacHrpG y XacR210C, la cepa mutante Xac Δ hrpG y las cepas complementadas.	102
Figura 5.7. Curvas de crecimiento bacteriano en plantas de naranja.	104
Figura 5.8. Respuesta HR en plantas no hospedadoras de tomate.	105
Figura 5.9. Ensayos de actividad proteasa, amilasa y celulasa.	107
Figura 5.10. Movilidad bacteriana de tipo swimming y swarming.	109
Figura 5.11. Expresión y detección de la proteína flagelina en extractos proteicos totales.	110

Figura 5.12. Análisis de expresión génica por RT-PCR en medio de cultivo rico.	112
Figura 5.13. Análisis de expresión génica por RT-PCR en medio de cultivo mínimo.	113
Figura 5.14. Análisis de expresión génica por RT-PCR in planta.	114
Figura 6.1. Modelo regulatorio del cluster <i>hrp</i> propuesto para <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .	127
Figura 6.2. Regiones promotoras de los genes <i>hrpG</i> y <i>hrpX</i> .	129
Figura 6.3. Secuencia del promotor putativo P _{hrpX} e identificación de elementos promotores mediante predicciones bioinformáticas.	130
Figura 6.4. Actividad transcripcional de las regiones promotoras P _{hrpX} y P _{hrpG} .	132
Figura 6.5. Purificación de las proteínas de fusión HrpG y R210C.	134
Figura 6.6. Interacción de HrpG y R210C con regiones promotoras del genoma de <i>Xac</i> .	139
Figura 6.7. Ensayos de competición específica e inespecífica.	142
Figura 6.8. Modelado estructural de HrpG de <i>Xac</i> .	144
Figura 6.9. Alineamiento de secuencias del extremo C-terminal de las proteínas HrpG de <i>Xac</i> y OmpR de <i>E. coli</i> .	146
Figura 6.10. Modelado estructural del dominio de unión al ADN de HrpG.	147
Figura 6.11. Posicionamiento del dominio de unión al ADN de los reguladores de la familia OmpR al interactuar con sus secuencias específicas de reconocimiento.	149

Índice de tablas

Tabla 3.1. Cepas bacterianas.	42
Tabla 3.2. Medios de cultivo.	44
Tabla 3.3. Plásmidos utilizados.	45
Tabla 3.4. Oligonucleótidos.	47
Tabla 3.5. Parámetros fotosintéticos (Adaptado de Baker y Rosenqvist, 2004).	60
Tabla 5.1. Medidas de los halos de actividad proteasa, amilasa y celulasa en medio XVM2.	107
Tabla 5.2. Diámetro de las colonias en placas de swimming y swarming.	110
Tabla 6.1. Cajas regulatorias de la región promotora putativa P_{hrpX} .	130
Tabla 6.2. Condiciones de reacción ensayadas en los experimentos de retardo en gel.	138

Abreviaturas y Símbolos

μCi: microCurie, equivale a 10^{-6} Curie o $3,7 \times 10^4$ Becquerel (Bq)

μE m⁻² s⁻¹: microEinsteins (o micromoles de fotones) por metro cuadrado por segundo, unidad ampliamente utilizada para medir la radiación fotosintéticamente activa o disponible.

aa: aminoácido

ADNasa: desoxirribonucleasa

Ap: ampicilina

APS: persulfato de amonio

ARNasa: ribonucleasa

BCIP: sal *p*-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

Bq: Becquerel, unidad del Sistema Internacional (SI) de medida de radiactividad, 1 Bq = 1 desintegración nuclear por segundo (dps)

Chl a: clorofila a

Chl b: clorofila b

Ci: Curie, unidad histórica de medida de radiactividad, 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel (Bq)

Cln: cloranfenicol

cpm: cuentas por minuto, medida de radiación detectada con aparatos como el contador de centelleo, cada cuenta medida corresponde a una desintegración radiactiva. Esta medida no está corregida por la eficiencia del aparato o la radiación basal del entorno.

CTAB: bromuro de cetil trimetil amonio

cv: cultivar

dNTP: desoxinucleósido 5'-trifosfato

DTT: ditioneitol

FSII: fotosistema II

GFP: proteína fluorescente verde

Gm: gentamicina

GST: glutatión-S-transferasa

HIS: histidina

HR: respuesta hipersensible

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

Km: kanamicina

LB: medio Luria-Bertani

mA: miliamperios

mCi: miliCurie, equivale a 10^{-3} Curie o $3,7 \times 10^7$ Becquerel (Bq)

Mpb: mega pares de bases, equivalen a 10^6 de pares de bases

mW: miliwatts o milivatios

NBT: cloruro de tetrazolio nitro-azul

Ni-NTA: perlas de agarosa derivatizadas con ácido nitrilotriacético cargado con iones divalentes de níquel (Ni)

nt: nucleótido

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: buffer fosfato salino

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro. Inhibidor de serin-proteasas

pv: patovar

Q_A: quinona. Aceptor primario de electrones

Rf: rifampicina

ROS: especie reactiva del oxígeno

rpm: revoluciones por minuto
SB: medio Silva Buddenhagen
SDS-PAGE: electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Sm: estreptomina
Sp: espectinomicina
SSTC: sistema de secreción de proteínas tipo IV
SSTD: sistema de secreción de proteínas tipo II
SSTT: sistema de secreción de proteínas tipo III
TAE: Tris-acetato-EDTA
TBE: Tris-ácido bórico-EDTA
TBq: teraBecquerel, equivale a 10^{12} Becquerel (Bq)
Tc: tetraciclina
TE: Tris-EDTA
TGE: Tris-glicina-EDTA
Trx: tiorredoxina
u: unidad de actividad enzimática, cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto, en una reacción.
UFC: unidades formadoras de colonias
V: voltios
Xac: *Xanthomonas axonopodis* patovar (pv.) *citri*
Xcc: *Xanthomonas campestris* patovar (pv.) *campestris*
Xcv: *Xanthomonas campestris* patovar (pv.) *vesicatoria*
Xoo: *Xanthomonas oryzae* patovar (pv.) *oryzae*

Anglicismos y Lenguaje especial

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón que permite controlar la concentración libre de un determinado compuesto a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo protones).

Cluster: conjunto o agrupamiento de genes que codifican para un mismo sistema o con funciones relacionadas.

In silico: término utilizado para designar experimentos, predicciones, modelados o resultados obtenidos mediante el uso de computadoras, programas de simulación y bases de datos disponibles en internet.

In vitro: término utilizado para referirse a técnicas o experimentos llevados a cabo generalmente en ambiente y condiciones controladas fuera del organismo vivo.

In planta: se refiere a experimentos llevados a cabo en el interior de las plantas, o en sus hojas y tejidos.

Pellet: sedimento obtenido en el fondo de un tubo luego de la centrifugación.

Western-Blot: ensayo de unión de anticuerpos a proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida inmovilizadas en un soporte de nitrocelulosa o nylon.

INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

1.1-Interacción planta-patógeno

Las plantas son organismos complejos, esenciales para la vida debido al proceso de fotosíntesis. La variabilidad genética, la plasticidad fenotípica y las interacciones con el medio ambiente muestran los múltiples factores involucrados en esta complejidad (Cramer y col., 2011). Las plantas requieren fundamentalmente de energía (luz), agua y nutrientes orgánicos y minerales para su crecimiento y desarrollo. Las continuas fluctuaciones en las condiciones ambientales pueden transformarse en un estrés abiótico para las plantas cuando el cambio es severo y constante o cuando las condiciones normales son agresivas de manera que modifican los procesos fisiológicos normales de la planta y reducen su crecimiento y rendimiento óptimo (dos Reis y col., 2012). Para sobrevivir a las condiciones ambientales adversas las plantas han desarrollado numerosos mecanismos para percibir los estímulos y señales externas que permiten la activación de diversas respuestas de defensa y adaptación. Las respuestas de las plantas al estrés abiótico son dinámicas y complejas y pueden ser reversibles o irreversibles, dependiendo del tejido u órgano afectado y de la duración e intensidad del estrés al cual son sometidas (Cramer y col., 2011). Las respuestas tienen componentes comunes y a la vez específicos para cada estrés particular, pero en general incluyen modificaciones en la composición y estructura de la membrana y la pared celular, cambios en la división celular, síntesis de moléculas protectoras, especies reactivas del oxígeno (ROS), metabolitos secundarios y hormonas vegetales. También se expresan diversos genes de respuestas a estrés, enzimas detoxificadoras y proteínas como los chaperones moleculares (Zhu, 2002; Hadacek y col., 2011; dos Reis y col., 2012).

Además de estar afectadas por las condiciones ambientales, las plantas se relacionan con otros organismos vivos del reino vegetal y animal. Las interacciones entre las plantas y los microorganismos son ubicuas pero en general, representan interacciones neutras o mutualistas, como hongos micorrizos y rizobios que forman nódulos y contribuyen a la fijación del nitrógeno y otros nutrientes en raíces y tubérculos; o bacterias y hongos que viven en el interior de las partes aéreas de las plantas (endofitos) o en la filosfera (epifitos) (Partida-Martínez y Heil, 2011). También se relacionan con nematodos, protozoarios, insectos y artrópodos (Agrios, 2004). Sin embargo, algunas

interacciones no son beneficiosas para la planta convirtiéndose en un estrés biótico. En estos casos el microorganismo se considera un patógeno que para completar parte o todo su ciclo de vida debe crecer dentro de la planta hospedadora (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Los patógenos pueden ingresar a la planta por medio de un ataque enzimático o mecánico de la superficie externa, a través de aberturas naturales como estomas y lenticelas, o a través de heridas y daños producidos previamente en el tejido; y pueden colonizar raíces, tallos, hojas y frutos e incluso los sistemas vasculares de la planta (Dangl y Jones, 2001). Si el patógeno infecta distintos órganos y tejidos o toda la planta, debido a su capacidad de moverse a través de los tejidos vasculares, la infección es de tipo sistémica; de lo contrario la infección sólo se localiza en el sitio de ingreso del patógeno afectando sólo a algunas células. Cuando ingresan en la planta, los patógenos utilizan distintas estrategias para nutrirse de la misma clasificándose en tres grupos principales: los necrotróficos, que matan las células de la planta hospedadora y se alimentan de los metabolitos y restos celulares (por ejemplo algunos hongos y artrópodos); los biotróficos, que necesitan mantener la planta con vida (por ejemplo los virus y las bacterias que colonizan el apoplasto vegetal); los hemibiotróficos, que inicialmente mantienen a las células vegetales con vida pero hacia el final de la infección el patógeno induce la muerte de las células hospedadoras (Alfano y Collmer, 1996; Hammond-Kosack y Jones, 2000).

La planta debe reconocer y activar diversos mecanismos de defensa frente al ataque de un patógeno. De estas respuestas depende que la planta sea resistente al patógeno controlando su crecimiento y diseminación; o que la planta se enferme debido a la falta de los mecanismos necesarios para contrarrestar el ataque del patógeno. Las respuestas de defensa de las plantas pueden ser localizadas en el sitio de ingreso del patógeno, como la respuesta hipersensible (HR); o sistémicas como la respuesta sistémica adquirida (SAR) para combatir infecciones futuras del patógeno o evitar la dispersión de una infección por distintos órganos y tejidos. Las respuestas de defensa de las plantas son inducidas por diversas moléculas y estímulos del patógeno e involucran la activación de diversos genes, metabolitos, hormonas vegetales y enzimas que en una intrincada red de señalización y mecanismos regulatorios activan repuestas complejas para contrarrestar el ataque del patógeno (Park y Paek, 2007).

De la gran cantidad y diversidad de patógenos a los que están expuestas las plantas sólo una pequeña proporción logra establecerse y generar enfermedad. Esto se debe a que para que una infección sea exitosa, el patógeno debe alterar el metabolismo del

hospedador para adquirir nutrientes y agua de la planta y crear condiciones favorables para su crecimiento (Berger y col., 2007). Las principales razones por las que un patógeno fracasa en infectar una planta se deben a que la planta no cumple con los requerimientos nutricionales del patógeno o no es apta para el crecimiento del mismo; la planta posee barreras preformadas estructurales o compuestos tóxicos y antimicrobianos que impiden la infección de ciertas especies de patógenos; o luego del ingreso y reconocimiento del patógeno la planta activa mecanismos de defensa que limitan la infección (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

Una interacción planta-patógeno incompatible, ocurre cuando la planta no se enferma debido a la interacción con el patógeno. Esto puede deberse a una resistencia del tipo hospedadora o no hospedadora. Por el contrario, cuando un patógeno es capaz de superar las defensas de la planta y tiene éxito en la infección, la planta se enferma y la interacción planta-patógeno es compatible, el patógeno se denomina virulento y la planta se considera hospedadora (Mysore y Ryu, 2004; Agrios, 2004).

1.1.1-Resistencia no hospedadora

La resistencia no hospedadora se da en todos los miembros de una especie de planta y puede ser de tipo I, que no produce síntomas visibles o de tipo II, que resulta en una rápida respuesta hipersensible y muerte celular (Mysore y Ryu, 2004). En la resistencia no hospedadora de tipo I el patógeno no puede superar las barreras preformadas ni las respuestas de defensa inducidas por elicitores generales del patógeno como la proteína flagelina o moléculas de superficie, conocidos como PAMPs (patrones moleculares asociados al patógeno). Se desencadenan respuestas de defensa generales como el engrosamiento de la pared celular, la síntesis de fitoalexinas y otros metabolitos secundarios que actúan como antimicrobianos. Aunque la planta no muestra síntomas, muchos cambios moleculares pueden ocurrir en la respuesta no hospedadora de tipo I (Oh y col., 2006). En la respuesta no hospedadora de tipo II el patógeno es capaz de superar las defensas preformadas y las respuestas inducidas por elicitores generales (PAMPs), probablemente produciendo enzimas detoxificadoras y elicitores del patógeno más específicos que son reconocidos por el sistema de vigilancia de la planta en el citoplasma o la membrana celular, para inducir una respuesta de defensa más específica que incluye la respuesta hipersensible (HR) (Mysore y Ryu, 2004; Jones y Dangl, 2006).

1.1.2-Resistencia hospedadora

La resistencia hospedadora o mediada por genes de resistencia (genes R) ocurre cuando sólo un cultivar o grupo específico de plantas es resistente a un patógeno. Esta respuesta comparte algunos mecanismos de defensa con la respuesta no hospedadora, como la respuesta HR o la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ROS), pero se diferencia porque depende de genes R cuyos productos proteicos interactúan directa o indirectamente con las proteínas efectoras producidas por los genes de avirulencia del patógeno (genes *avr*) (Mysore y Ryu, 2004).

1.2-Mecanismos de defensa de las plantas

Antes de ingresar a la planta y causar enfermedad el patógeno se encuentra con barreras preformadas en la superficie exterior de la planta como la capa cuticular laxa, compuesta principalmente por ceras, que constituye una protección pasiva al ataque por diversos patógenos. Al mismo tiempo, los patógenos entran en contacto con compuestos antimicrobianos preformados, siendo las saponinas y los glucosinolatos los más caracterizados (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Si bien estos sistemas de protección son muy efectivos, algunos patógenos han desarrollado mecanismos para evadirlos. Existen factores de virulencia bacterianos como toxinas, compuestos homólogos a hormonas de plantas, autoinductores y exopolisacáridos, que son utilizados por la bacteria para promover la enfermedad. Entre las toxinas bacterianas que cumplen un rol importante en la virulencia y el desarrollo de síntomas se encuentran coronatina, siringomicina, siringopeptina, tabtoxina y faseolotoxina (Bender y col., 1999). Estas toxinas pueden causar clorosis o necrosis en los tejidos afectados mediante diversos mecanismos de acción que incluyen la mimetización con hormonas de plantas, la formación de poros en las membranas vegetales o la inhibición de enzimas metabólicas del hospedador. Por ejemplo, muchas cepas de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* producen homólogos de la hormona auxina, interfiriendo con las respuestas de la planta al suprimir mecanismos de defensa específicos (Navarro y col., 2006). Sin embargo, las plantas poseen diversos sistemas para percibir los ataques de patógenos y mediante la transmisión de señales activan un gran repertorio de mecanismos de defensa (Agrios, 2004, Park y Paek, 2007). En general, la respuesta al ataque por un patógeno incluye apertura de canales iónicos, producción de ROS y óxido nítrico (NO), producción de hormonas como ácido salicílico,

ácido jasmónico y etileno, activación de enzimas preformadas que modifican el metabolismo primario y secundario, modificación del estado de fosforilación de proteínas, y activación transcripcional de un gran número de genes relacionados con la defensa (Yang y col., 1997; Hammond-Kosack y Jones, 2000). Estos procesos son coordinados tanto espacial como temporalmente asegurando la minimización del consumo energético y la participación de la cantidad mínima necesaria de células de la planta. La inducción rápida y localizada de la respuesta de defensa de la planta tiene como objetivo principal el establecimiento de un ambiente desfavorable para el crecimiento y reproducción del patógeno. En resumen, las plantas poseen una defensa inmune innata que utilizan cuando las barreras de defensa pasivas son superadas, previniendo de esta manera la enfermedad. Si este sistema es desafiado por el patógeno, la planta es capaz de activar mecanismos de defensa activos y más específicos (Chisholm y col., 2006). Si bien los mecanismos de defensa de las plantas pueden ser inducidos de diversas maneras, muestran algunas características similares como ciertos mecanismos moleculares y respuestas comunes como la respuesta hipersensible (HR).

1.2.1-Respuesta hipersensible

La respuesta hipersensible (HR) es una respuesta rápida alrededor y en el sitio inicial de infección que comienza a las pocas horas del contacto de la planta con el patógeno (Greenberg y Yao, 2004). Durante la HR se activan respuestas de defensa complejas que crean un ambiente desfavorable para el patógeno y la muerte de algunas células vegetales para impedir la progresión de la infección y la diseminación del patógeno. Cuando se inoculan hojas con concentraciones bacterianas similares a las encontradas en la naturaleza, la respuesta HR se visualiza como células vegetales individuales que están muertas y dispersas entre el tejido vegetal saludable; sin embargo, inoculaciones experimentales con elevadas concentraciones de inóculo (10^6 UFC/ml) resultan en la muerte celular de todo el tejido infiltrado que puede observarse macroscópicamente como manchas necróticas, generalmente a las 24 hs post inoculación (Alfano y Collmer, 1997). La muerte celular puede deberse a un programa de muerte celular regulado o a la necrosis producida por los compuestos tóxicos y radicales libres que sintetizan las mismas células vegetales. En las células afectadas se sintetizan especies reactivas del oxígeno (ROS) como H_2O_2 , anión superóxido y radicales hidroxilo; óxido nítrico que inhibiría la catalasa y otras enzimas detoxificadoras de ROS. También se producen calosa, lignina y

otros compuestos que fortifican la pared celular; fitoalexinas y compuestos antimicrobianos; hormonas vegetales como etileno y ácido salicílico; etc. (Greenberg, 1996; Hammond-Kosack y Jones, 2000). Otro fenómeno detectado en la HR es la peroxidación lipídica y el daño a lípidos, que puede ser responsable del cambio que experimenta la célula afectando el funcionamiento normal de la membrana. También se detectó inducción de genes relacionados con la respuesta de defensa a patógenos como 1,3-glucanasa y quitinasa, cambios en la morfología mitocondrial, escisión endonucleolítica de ADN y condensación de la cromatina relacionados con la apoptosis (Lam y col., 2001; Coll y col., 2011).

1.2.2-Inmunidad innata o inmunidad inducida por PAMPs

Las plantas, a diferencia de los mamíferos, no poseen células de defensa móviles y un sistema inmune adaptativo, por eso dependen de la inmunidad innata de cada célula y de diversas señales sistémicas que provienen de otros sitios de infección de la planta para defenderse frente al ataque de un patógeno (Dangl y Jones, 2001; Chisholm y col., 2006). Luego de atravesar las barreras en la superficie exterior de las plantas, los patógenos deben superar otro obstáculo: la pared celular rígida y compuesta de celulosa que rodea las células vegetales. La penetración de la pared celular mediante la acción de diversos compuestos microbianos como enzimas celulasas, expone la membrana plasmática de la célula vegetal donde el patógeno se encuentra con receptores de superficie que reconocen patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs, del inglés, pathogen-associated molecular patterns) (Chisholm y col., 2006). La inducción de la inmunidad innata de las plantas se debe al reconocimiento inicial del patógeno por medio de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, del inglés, pattern recognition receptor) asociados a la membrana plasmática vegetal que perciben los PAMPs (figura 1.1A). Los PAMPs son estructuras altamente conservadas entre un amplio grupo de microorganismos y normalmente no se encuentran presentes en el organismo hospedador (Chisholm y col., 2006; Zhang y Zhou, 2010). Generalmente cumplen una función crítica en la vida del microorganismo y se trata de componentes de la superficie celular bacteriana, entre los que se incluyen la flagelina que es la proteína constitutiva del flagelo (Gómez-Gómez y Boller, 2002), el lipopolisacárido (LPS) que es el mayor constituyente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y el factor de elongación Tu (EF-Tu) que es una de las proteínas bacterianas más abundantes (Zipfel y

col., 2004; Chisholm y col., 2006; Ingle y col., 2006). El reconocimiento de los PAMPs, inicia cascadas de señalización en la célula vegetal que desencadenan una respuesta de defensa inducida conocida como inmunidad inducida por PAMPs o PTI (del inglés, PAMP-triggered immunity) (Jones y Dangl, 2006; Schwessinger y Zipfel, 2008) (figura 1.1A).

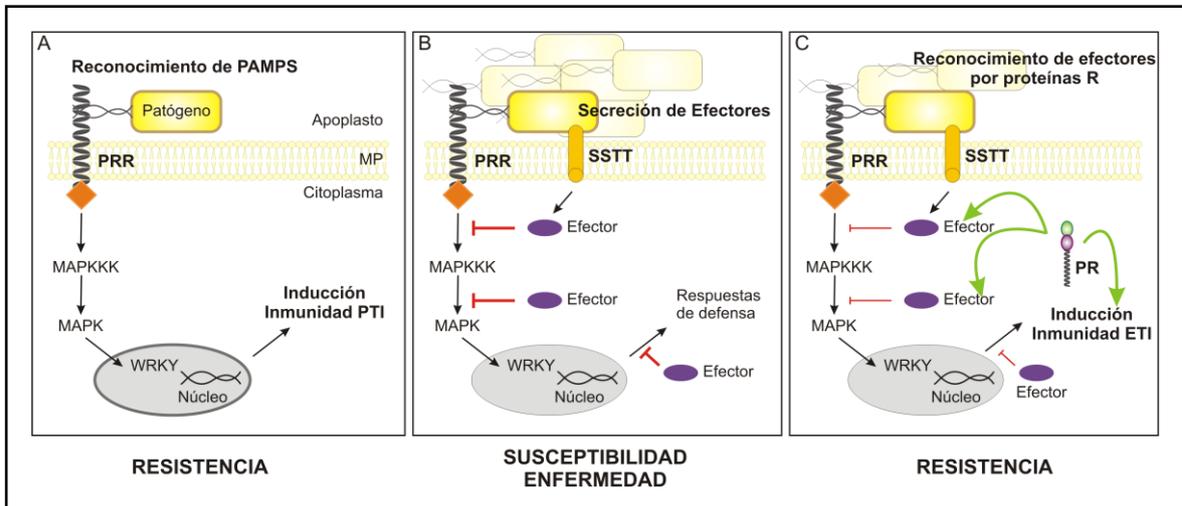


Figura 1.1. Modelo evolutivo de las interacciones planta-patógeno. Inmunidad PTI y ETI.

En los diagramas se muestra el reconocimiento de los PAMPs asociados al patógeno como la flagelina del flagelo bacteriano, por receptores de la planta (PRR) que mediante la activación de cascadas de señalización que involucran a proteínas MAPK, activan factores de transcripción nucleares (ej. los factores tipo WRKY) y otras respuestas de defensa que inducen la inmunidad PTI, generando resistencia en la planta (A). Algunos patógenos más evolucionados pueden superar estas barreras de defensa mediante la acción de proteínas efectoras translocadas por el sistema de secreción de proteínas tipo III (SSTT) que inhiben las respuestas de defensa (líneas rojas), causando susceptibilidad y enfermedad en la planta (B). A pesar de esto, las plantas también evolucionaron generando proteínas R de resistencia que inhiben la acción de las proteínas efectoras o las detectan (líneas verdes) para activar una respuesta de defensa activa y más específica desencadenando la inmunidad ETI, y resistiendo al ataque del patógeno (C). Si el patógeno genera nuevas proteínas efectoras para superar la defensa mediada por las proteínas R el ciclo vuelve a repetirse, generando una constante competencia entre patógenos y plantas representado por el modelo “zig-zag” (ver en el texto). MP: membrana plasmática. Adaptado de Chisholm y col., 2006.

Algunas respuestas mediadas por la inmunidad PTI incluyen la producción de ROS y óxido nítrico, el engrosamiento de la pared celular por deposición de calosa para reforzarla en los sitios de infección, la activación de cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la inducción transcripcional de genes de respuesta al patógeno (PR, por pathogen response), la alteración de la transcripción génica y secreción de compuestos antimicrobianos (Nürnberg y col., 2004; Chisholm y col., 2006). Junto con las defensas pasivas dadas por la cutícula cerosa y los compuestos antimicrobianos

preformados, estas respuestas constituyen la primera línea de defensa basal efectiva contra la mayoría de los patógenos potenciales, generalmente impidiendo el crecimiento y el establecimiento del patógeno en la planta (Dangl y Jones, 2001).

1.2.3-Inmunidad inducida por proteínas efectoras

Muchos patógenos bacterianos son capaces de superar las respuestas de defensa pasivas y suprimir las respuestas inducidas por la inmunidad PTI a través de la secreción y translocación de proteínas efectoras que son dirigidas al interior de la célula vegetal por medio del sistema de secreción de proteínas tipo III (SSTT), pudiendo entonces multiplicarse y diseminarse por el tejido vegetal (figura 1.1B). A pesar de esto, las plantas han evolucionado junto con los patógenos, y poseen proteínas de resistencia o proteínas R, que pueden interactuar o reconocer los efectos de las proteínas efectoras bacterianas para activar respuestas de defensa más eficaces contra el patógeno y evitar el desarrollo de la enfermedad (figura 1.1C). Este mecanismo de defensa se denomina inmunidad inducida por efectores o ETI (del inglés, efector-triggered immunity) (Jones y Dangl, 2006). La ETI es un mecanismo de defensa mediado por proteínas R y comparte respuestas de defensa con la inmunidad PTI que limitan el crecimiento microbiano evitando su dispersión y persistencia en la planta (Chisholm y col., 2006). Algunas respuestas de defensa comunes entre la inmunidad PTI y la ETI son la síntesis de ROS y la respuesta hipersensible (HR) (Mysore y Ryu, 2004). La inmunidad ETI también puede conducir a la resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés systemic acquired resistance) que inicia respuestas de defensa en tejidos distantes del sitio de inicio de infección, confiriendo una resistencia de amplio espectro para el posterior ataque de patógenos (Durrant y Dong, 2004). Al igual que la inmunidad PTI, la ETI suprime el crecimiento del patógeno, pero lo hace luego de que el patógeno pueda tener la oportunidad de proliferar en la planta (figura 1.1B). La diferencia fundamental entre la inmunidad PTI y la ETI es que, esta última depende de genes de resistencia (R) cuyos productos proteicos interactúan directa o indirectamente con las proteínas efectoras producidas por los genes de avirulencia del patógeno (genes *avr*) (Jones y Dangl, 2006).

La compleja relación que existe y co-evoluciona entre un patógeno y una planta, y los mecanismos que constituyen el sistema inmune de las plantas se pueden representar con un modelo de tipo “zig-zag”, que muestra la compleja relación entre PAMPs y proteínas efectoras con receptores PRR y proteínas R (Jones y Dangl, 2006; Thomma y

col., 2011). Inicialmente, los PAMPs son reconocidos por los receptores PRR de la planta, desencadenando la inmunidad PTI que puede detener la colonización del tejido por parte del patógeno (figura 1.1A). En una segunda etapa, los patógenos capaces de introducir proteínas efectoras en la planta pueden interferir con la inmunidad PTI generando susceptibilidad y enfermedad dependiente de los efectores (ETS) (figura 1.1B), pero si un efector es reconocido específicamente por una proteína R, ya sea directa o indirectamente, desencadena la inmunidad ETI (figura 1.1C) que resulta en la resistencia a la enfermedad (Boller y He, 2009). La evolución y la selección natural permiten que los patógenos eviten la resistencia ETI, ya sea perdiendo y diversificando los genes efectores o adquiriendo efectores adicionales que supriman la inmunidad ETI. Por otro lado, la selección natural también permite la diversificación de las proteínas R para que se reanude la inmunidad ETI y continúe el ciclo con una nueva respuesta de defensa (Rausher, 2001; Jones y Dangl, 2006).

1.3-Mecanismos de interacción entre proteínas efectoras y proteínas de resistencia

La inmunidad ETI depende de proteínas efectoras de origen bacteriano que ingresan al interior de la célula vegetal y son reconocidas por proteínas vegetales de resistencia o proteínas R. En la actualidad existen dos hipótesis relacionadas con la interacción entre proteínas efectoras y proteínas R. Una de ellas supone una interacción directa entre ambos tipos de proteínas para el desarrollo de resistencia en la planta (Modelo de gen por gen; Flor, 1971). El modelo alternativo supone una interacción indirecta entre ambos tipos de proteínas donde participarían otras proteínas vegetales como intermediarias entre las proteínas efectoras y las proteínas R, en este modelo las proteínas R actuarían protegiendo o percibiendo cambios en maquinarias o proteínas de la planta que son blancos de las proteínas efectoras bacterianas (Hipótesis de la guarda; van der Biezen y Jones, 1998a; Dangl y McDowell, 2006). A continuación se describen las características principales de ambos modelos propuestos para la interacción entre las proteínas efectoras y las proteínas R.

1.3.1-Modelo de gen por gen o de receptor-ligando

Este modelo de interacción entre las proteínas efectoras bacterianas y las proteínas R de la planta surgió a mediados del siglo pasado como resultado del estudio de la interacción entre plantas de lino y un hongo patógeno, *Melampsora lini* (Flor, 1956). Se observó que la resistencia se daba sólo cuando la planta poseía un gen de resistencia dominante (R) y el patógeno expresaba un gen de avirulencia dominante complementario (Avr). Por el contrario, cuando los alelos de los genes R y Avr que interaccionaban eran, uno dominante y el otro recesivo, o ambos recesivos, se observaba enfermedad (Flor, 1971). En los años siguientes se describieron interacciones entre plantas y patógenos de especies diferentes a las estudiadas inicialmente por Flor que avalaron este modelo, en el cual las proteínas efectoras funcionan como ligandos de las proteínas R y esta interacción desencadena una transducción de señales que culmina en la activación de mecanismos de defensa y la limitación del crecimiento del patógeno. Existen algunos ejemplos de interacción directa Avr-R (Jia y col., 2000; Deslandes y col., 2003). Por ejemplo, los alelos del locus L de lino que codifican proteínas R del tipo NB-LRR interaccionaron en levadura con sus correspondientes proteínas efectoras bacterianas denominadas AvrL (Dodds y col., 2006). Las proteínas L y AvrL se encuentran en un proceso de selección natural de diversificación, que implica una constante competencia evolutiva entre patógenos y plantas. La diversidad alélica de otros efectores de hongos y oomicetos patógenos y de sus correspondientes proteínas R, también sugiere una interacción directa entre las proteínas, aunque en ciertos casos todavía faltan evidencias experimentales que verifiquen las interacciones físicas entre estas proteínas (Jones y Dangl, 2006).

1.3.2-Modelo o Hipótesis de la guarda

Durante muchos años se pensó que los productos de los genes R actuaban como receptores que directamente interaccionaban con los productos de los genes Avr (o proteínas efectoras). Este modelo receptor-ligando estuvo avalado por co-localizaciones de proteínas R y Avr y por algunos ejemplos de interacciones directas entre estas proteínas. Numerosos trabajos realizados durante la última década cuestionan el modelo de gen por gen debido a que las plantas tienen un repertorio limitado de genes R en contraste con la gran diversidad de proteínas efectoras encontradas en la literatura, y también se ha observado que las proteínas efectoras del patógeno pueden actuar modificando o alterando directamente distintos procesos celulares del hospedador. A

pesar de la caracterización de proteínas R y proteínas efectoras en una determinada interacción planta-patógeno, se detectaron pocas interacciones físicas directas entre las mismas, sugiriendo la participación de una o más proteínas en el reconocimiento del patógeno y la activación de la defensa. Así surgió la hipótesis de una interacción indirecta entre proteínas R y efectoras, conocida como modelo de la guarda (van der Biezen y Jones, 1998a; van der Hoorn y Kamoun, 2008). En este modelo se propone que las proteínas R funcionan protegiendo a proteínas de la célula hospedadora que interaccionan con los efectores del patógeno, y al percibir alguna alteración activan señales para disparar las respuestas de defensa (Dangl y Jones, 2001). En este modelo está implícita la noción de que las proteínas blanco de los efectores bacterianos son indispensables para la función y virulencia de la proteína efectora cuando está ausente la respectiva proteína R (van der Hoorn y Kamoun, 2008).

Uno de los primeros ejemplos del modelo de la guarda que llevó al cuestionamiento del modelo de gen por gen (van der Biezen y Jones, 1998a) se basa en el reconocimiento de la proteína efectora AvrPto de *Pseudomonas syringae* por la proteína quinasa Pto y la proteína de resistencia Prf del tipo NBS-LRR, en tomate. Según el modelo de la guarda se propuso que Pto representaría el blanco y Prf la proteína R protectora, y efectivamente se observó mediante ensayo de doble híbrido en levaduras que AvrPto interacciona físicamente con Pto (Tang y col., 1996). Otro ejemplo, que también involucra al fitopatógeno *P. syringae*, involucra a las proteínas efectoras AvrB y AvrRpm1 que interactúan con la proteína RIN4 de Arabidopsis, mediante su fosforilación. RIN4 también interactúa con la proteína RPM1, que es una proteína R del tipo NBS-LRR. Estas interacciones se confirmaron mediante ensayos de doble híbrido en levaduras y con ensayos de co-inmunoprecipitación (Mackey y col., 2002). Por lo tanto, RIN4 sería el verdadero blanco de las proteínas efectoras del patógeno y RPM1 la proteína R que protege a RIN4. Incluso, se observó que otra proteína efectora, AvrRpt2, induce la eliminación de RIN4, pero en este caso la proteína R involucrada es RPS2, que pareciera activarse con la pérdida de RIN4. RPS2 también interactúa físicamente con RIN4 (Mackey y col., 2003). En este ejemplo, la proteína RIN4 de Arabidopsis es el blanco de al menos tres proteínas efectoras de *P. syringae* y a su vez, es protegida por al menos dos proteínas R diferentes (Kim y col., 2005). En otro caso, la proteína efectora AvrPphB con actividad cisteín quinasa de *P. syringae* es reconocida en Arabidopsis tanto por una proteína del tipo NBS-LRR, RPS5; como por la proteína quinasa PBS1 (Warren y col., 1999). Mediante

ensayos de supresión de RPS5 o PBS1, se observó un bloqueo en el reconocimiento de AvrPphB, pero estas mutaciones no produjeron efectos sobre otros genes R de Arabidopsis, ni se observaron cambios morfológicos. También se observó que AvrPphB produce un corte proteolítico en el dominio de activación de PBS1 y que esta modificación es necesaria para la activación de la resistencia mediada por RPS5 (Shao y col., 2003). Así, RPS5 podría funcionar como una proteína R que percibe el daño específico ocasionado a PBS1. Todos estos ejemplos muestran que el modelo es complejo, una proteína de la planta puede ser blanco de varias proteínas efectoras y puede estar protegida también por distintas proteínas R (Innes, 2004). Las proteínas R se pueden activar detectando cambios conformacionales en la proteína blanco, o con la degradación y modificación de la misma. En ausencia del patógeno las proteínas R se ensamblan en complejos proteicos multiméricos que permiten el reconocimiento indirecto de las moléculas efectoras del patógeno ante una invasión (Shirasu y Schulze-Lefert, 2003). La hipótesis de la guarda explica cómo hace Arabidopsis para detectar a todos los patógenos posibles con menos de 250 genes R que se encontraron en su genoma, ya que la planta no necesita detectar a las múltiples moléculas efectoras de los patógenos sino el daño producido por ellas (Dangl y Jones, 2001; Innes, 2004).

A pesar de las diferencias entre el modelo de gen por gen y la hipótesis de la guarda, las evidencias experimentales sugieren que ambos pueden ser válidos. Los patógenos evolucionan más rápido y mediante mutagénesis y transferencia horizontal de genes pueden modificar y adquirir nuevas proteínas efectoras evadiendo las respuestas de defensa de la planta. Entonces el reconocimiento indirecto de las proteínas efectoras a través de las proteínas R, le otorga a la planta un mecanismo para percibir múltiples efectores que puedan converger en un mismo blanco. Sin embargo, en la interacción directa propuesta por el modelo receptor-ligando se podrían reconocer efectores que no necesariamente provocan alteraciones en proteínas blanco de la planta. Los dos modelos podrían ser complementarios (Dangl y McDowell, 2006) y la adopción de uno u otro por parte de las plantas para reconocer a un patógeno dependería del estilo de vida del patógeno y la función de la proteína efectora. Los patógenos con amplio rango de hospedador podrían tener proteínas efectoras que causen efectos severos en distintas plantas hospedadoras. Por el contrario, los patógenos con menor rango de hospedador podrían tener efectores que produzcan cambios sutiles en la planta (Dodds y col., 2006).

1.3.3-Proteínas efectoras

Los efectores bacterianos contribuyen a la virulencia del patógeno, generalmente imitando o inhibiendo funciones celulares eucariotas (Mudgett, 2005). Las proteínas efectoras están codificadas por los denominados genes de avirulencia (Avr), no poseen mucha similitud en sus secuencias aminoacídicas y en general son hidrofílicas y solubles. Estas proteínas ingresan a la planta por el sistema de secreción de proteínas tipo III (SSTT) (Alfano y Collmer, 1997) y según los modelos descritos anteriormente, las proteínas efectoras pueden interaccionar con proteínas R o con otras proteínas vegetales con el fin de alterar distintos mecanismos o procesos celulares que ayuden a la colonización del tejido vegetal (Chang y col., 2004; Chisholm y col., 2006).

Los genes de muchas proteínas efectoras secretadas por el SSTT poseen un elemento regulatorio en *cis*, denominado caja PIP (promotor inducible en planta) (Koebnik y col., 2006), que es reconocido por el regulador de la familia AraC, HrpX, activado *in planta* por el regulador HrpG del SSTT (Wengelnik y col., 1996b). Mediante la búsqueda de estas cajas PIP en los genomas de distintos patógenos bacterianos se identificaron numerosos genes putativos que codifican proteínas efectoras, sin embargo muy pocas han sido caracterizadas bioquímicamente hasta el momento. Algunas proteínas efectoras poseen actividad SUMO proteasa (SUMO, del inglés small-ubiquitin-like modifier), cisteína proteasas, tirosina fosfatasa, inhibidores de proteasas y quinasas, y ubiquitina ligasas (Chang y col., 2004; Innes, 2004; Chisholm y col., 2006; Dangl y McDowell, 2006; Cui y col., 2009). Estas funciones son las responsables de modificar las proteínas del hospedador y de esta manera potenciar la acción virulenta del patógeno o evadir la detección de los sistemas de defensa de la planta. Algunas proteínas efectoras están dirigidas a localizaciones subcelulares específicas, como AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y AvrXa10 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, que contienen señales de localización nuclear (NLS, del inglés nuclear localization signal) necesarias para el reconocimiento por parte de la proteína R correspondiente en el núcleo de las células del hospedador, y además poseen un dominio activador ácido con características de factores transcripcionales eucariotas (Yang y Gabriel, 1995). AvrBs3 también posee repeticiones de un motivo de 34 aminoácidos, que determinaría su especificidad (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Las proteínas efectoras suelen categorizarse también según si modifican de manera reversible o no los componentes celulares vegetales (Hajri y col., 2009; White y col., 2009).

Las bacterias patógenas de animales secretan un número limitado de proteínas efectoras en las células eucariotas hospedadoras, sin embargo los patógenos de plantas como *P. syringae* pueden secretar entre 20 y 30 efectores durante una infección (Chang y col., 2005). Como se mencionó anteriormente, los efectores poseen actividades enzimáticas y son translocados desde el citoplasma bacteriano a la célula hospedadora mediante el SSTT, por lo que los patógenos deben protegerse de estas actividades enzimáticas potencialmente dañinas para ellos. Experimentos en patógenos de mamíferos demuestran que los efectores serían secretados en un estado desplegado y podrían estar asociados a proteínas chaperonas específicas o generales que los mantienen en un estado inactivo y luego en la célula hospedadora podrían ser activados por proteínas eucariotas o mediante alguna modificación post-traducciona (Akedá y Galán, 2005; Chisholm y col., 2006).

1.3.4-Proteínas de resistencia

Las proteínas de resistencia o proteínas R de las plantas tienen dos funciones básicas: el reconocimiento y la interacción con proteínas efectoras (o proteínas blanco, según la hipótesis de la guarda); y luego, la activación de una o varias vías de transducción de señales que conducen a la inducción de respuestas de defensa (Dangl y Jones, 2001).

Las proteínas R, pueden ser receptores transmembrana con o sin dominio quinasa, quinasas citosólicas y proteínas citosólicas. La existencia de proteínas R citoplasmáticas o transmembranas sugiere que pueden detectar ligandos secretados, en la superficie del patógeno o en el interior de la célula hospedadora (Dangl y Jones, 2001). En las últimas dos décadas se clonaron alrededor de 40 genes R, que en general pertenecen a la familia NB-LRR, con dominios de unión a nucleótidos (NB, del inglés nucleotide binding site) y dominios ricos en leucina (LRR, del inglés leucine rich repeats) (Lukasik y Takken, 2009). Los motivos de unión a nucleótidos presentan gran similitud de secuencia con las regiones NB de reguladores de apoptosis como CED4 de *Caenorhabditis elegans* y Apaf1 de humanos (van der Biezen y Jones, 1998b; Dangl y Jones, 2001). El dominio NB es parte de un dominio mayor denominado NB-ARC con diversos motivos, y muchas de estas proteínas pertenecen a la familia STAND (del inglés signal transduction ATPases with numerous domains), que comprende proteínas con actividad de unión e hidrólisis de ATP u otros nucleótidos trifosfatos (NTPs) (Tameling y col., 2006). Los dominios NB-ARC de las proteínas R tendrían 3 subdominios: el dominio NB que forma un loop o bucle con la

actividad NTPasa, el dominio ARC1 con 4 hélices α y el ARC2 con un motivo de hélices alado (Takken y col., 2006; Tameling y Takken, 2008). Excepto las quinasas citosólicas, todas las proteínas R tienen dominios LRR, de 20 a 30 aminoácidos de longitud, que se identificaron en proteínas de diversos organismos y se asocian a interacciones proteína-proteína, unión ligando-péptido e interacción proteína-carbohidratos. Análisis de secuencias muestran que las superficies de los dominios LRR que hacen contacto con los ligandos se encuentran en un proceso de diversificación, consistente con la idea de que estos dominios son los que interactuarían con las proteínas del patógeno otorgando la especificidad a la interacción (Kobe y Kajava, 2001; Caplan y col., 2008; Padmanabhan y col., 2009).

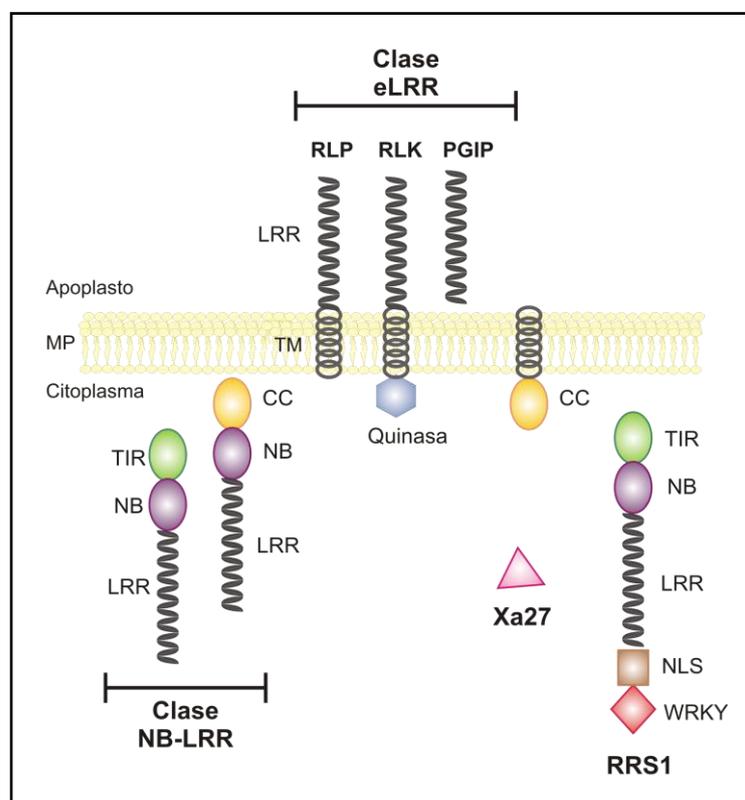


Figura 1.2. Clasificación de proteínas de resistencia.

Representación de las clases principales de proteínas R y sus dominios característicos. Dentro de la clase NB-LRR, con dominios de unión a nucleótido (NB) y motivos ricos en leucinas (LRR) se representan las subclases con extremos N-terminales de tipo Toll-interleukina-1 (TIR) o coiled-coil (CC) (TIR-NB-LRR y CC-NB-LRR). En la clase de proteínas R con dominios LRR extracelulares (eLRR), se representan las subclases RLP, con dominio transmembrana (TM); RLK, con dominio TM y quinasa citoplasmática; y PGIP con actividad inhibitoria de poligalacturonidasa. También se representan otras proteínas R como Xa7 que no posee homología de secuencia con proteínas R conocidas y RRS1 que es del tipo NB-TIR-LRR pero además posee una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio con homología a factores de transcripción WRKY. Adaptado de Chisholm y col., 2006.

Los genes R, codifican para dos clases principales de proteínas R según la organización de sus dominios (figura 1.2). Las proteínas R que poseen dominios NB-LRR son el mayor grupo y se pueden subdividir en dos subclases: las TIR-NB-LRR, con dominios similares a los receptores Toll de *Drosophila* e Interleuquina 1 de humanos, y las no-TIR o CC-NB-LRR, que contienen un dominio CC (coiled-coil) (figura 1.2) (Dangl y Jones, 2001; Chisholm y col., 2006). Algunos miembros del grupo de proteínas NB-LRR mejor caracterizados son las proteínas R de *Arabidopsis* RPS2, RPM1 y RPS5, que confieren resistencia frente al ataque del patógeno *P. syringae*. Sólo en la planta modelo *Arabidopsis* se han encontrado más de 150 proteínas del tipo NB-LRR, confiriéndole resistencia a patógenos bacterianos, virus, hongos y oomicetos (Dangl y Jones, 2001). Otro grupo mayoritario de genes R codifica para proteínas LRR extracelulares (eLRR), que se pueden subdividir en tres clases de acuerdo a la estructura de sus dominios (figura 1.2) (Chisholm y col., 2006). Estas subclases incluyen el receptor denominado RLP que contiene un dominio transmembrana (TM) y un dominio LRR extracelular; el receptor RLK, con un dominio TM, un dominio LRR extracelular y una quinasa citoplasmática; y la subclase PGIP, que contiene un dominio LRR de pared celular unido a una proteína inhibitoria de poligalacturonidasa. Entre las proteínas R extracelulares mejor caracterizadas se encuentran las del subgrupo RLP, representadas por los genes Cf de tomate, que le confieren resistencia a la infección por el patógeno biotrófico *Cladosporium fulvum*. Otra proteína LRR extracelular caracterizada es Xa21, perteneciente al subgrupo RLK, que se encuentra presente en arroz y responde ante moléculas efectoras secretadas por el patógeno *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Wang y col., 1998). Si bien la mayoría de las proteínas R caracterizadas pertenecen a alguno de los grupos descritos, existen ejemplos de proteínas R con dominios y funciones diversas, por ejemplo RRS1 que reconoce a *Ralstonia solanacearum*, es una proteína de la clase TIR-NB-LRR que además presenta una señal de localización nuclear C-terminal (NLS) y un dominio WRKY de activación transcripcional (figura 1.2) (Deslandes y col., 2003). Recientemente Xa27 ha sido aislada en arroz, y en su secuencia proteica no se encontró homología con ninguna proteína R y su expresión sólo ocurre en los alrededores del tejido infectado con el patógeno *X. oryzae* pv. *oryzae* que posee la proteína efectora AvrXa27 (figura 1.2). Se determinó que Xa27 depende de una señal N-terminal para poder localizarse en el apoplasto vegetal (Gu y col., 2004; Wu y col., 2008).

Generalmente los genes R se organizan en familias multigénicas (Hammond-Kosack y Jones, 2000). Estas proteínas probablemente se pliegan y mantienen un estado competente para la señalización gracias a la acción de Hsp90 citosólicas y otros chaperones y co-chaperones, que además asistirían el ensamblado de las proteínas R en complejos multiméricos para el reconocimiento del patógeno (Shirasu y Schulze-Lefert, 2003; Schulze-Lefert, 2004). La activación de las proteínas R normalmente activa la respuesta HR o repuestas de defensa que conducen a la muerte celular, por lo que deben estar altamente reguladas mediante interacciones intra- e inter-moleculares y cambios conformacionales para que estas respuestas no se disparen a menos que se detecte alguna amenaza por parte de un patógeno (Lukasik y Takken, 2009). Las mutaciones en los genes Avr que codifican las proteínas efectoras del patógeno parecen ser más frecuentes que en los genes R, sin embargo existen polimorfismos en los loci de los genes R que pueden superar ampliamente el polimorfismo de otros loci y también pueden reducir la adaptación del patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Dangl y Jones, 2001; Dangl y McDowell, 2006).

Hasta el momento se conoce muy poco sobre las proteínas blanco vegetales y cómo son modificadas por las proteínas efectoras. En este contexto es importante identificar proteínas de la planta que interaccionen con proteínas efectoras bacterianas para entender los mecanismos moleculares de resistencia o enfermedad y que puedan conducir a la identificación de nuevas proteínas blanco o proteínas R (Alfano, 2009).

1.4-Cancrosis de los cítricos

1.4.1-Características del género Xanthomonas

El género Xanthomonas, incluye a bacterias que están asociadas a plantas aunque no siempre como patógenos. Se trata de bacterias Gram-negativas, de la subdivisión Gamma de Proteobacteria, generalmente con forma de bacilo y aerobios obligados (Bradbury, 1984). Se mueven por la presencia de un único flagelo polar y las colonias se caracterizan por poseer una fuerte coloración amarilla debido a la producción del pigmento xantomonadina, asociado a la membrana bacteriana y que cumpliría un rol protector frente a daños fotobiológicos (Starr y Stephens, 1964; Jenkins y Starr, 1982; Rajagopal y col., 1997).

Las especies del género poseen un amplio rango de hospedador que incluye alrededor de 68 familias de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, como árboles frutales, solanáceas, brasicáceas y cereales, sin embargo cada especie posee un rango muy limitado (Hayward, 1993) Las especies vegetales que sirven como hospedadoras del patógeno se indican con la denominación patovar (pv.) y dentro del género *Xanthomonas* existen alrededor de 140 patovares distintos (Hayward, 1993). Por ejemplo, *X. axonopodis* pv. *citri* afecta a plantas Rutáceas, principalmente de los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus* (Brunings y Gabriel, 2003) y *X. campestris* pv. *vesicatoria* afecta a especies de los géneros *Capsicum* y *Lycopersicon* (Thieme y col., 2005). Estas bacterias, causan una variedad de síntomas incluyendo necrosis, cancrrosis, puntos y manchas, afectando a diversas partes de las plantas, incluyendo hojas, tallos y frutos (Leyns y col., 1984). Inicialmente las especies del género se clasificaron individualmente según su rango de hospedador, y luego se agruparon en la especie *Xanthomonas campestris* que se subdividió en patovares diferentes (Dye y Lelliot, 1974; Starr, 1981). Después de varias reclasificaciones taxonómicas, aún sigue en debate la nomenclatura y clasificación de las 19 especies y los 140 patovares que aproximadamente existen en la actualidad (Schaad y col., 2000; Vauterin y col., 2000; Rademaker y col., 2005).

Dentro del género *Xanthomonas* se han reportado diferencias específicas de cepa en los mecanismos de virulencia y esto podría reflejar adaptaciones particulares de las bacterias a sus respectivas plantas hospedadoras. Por lo tanto, las estrategias de virulencia descritas para patovares y cepas individuales de *Xanthomonas* spp., no necesariamente se aplican a otras bacterias del género (Büttner y Bonas, 2010).

1.4.2-Epidemiología y características principales de la enfermedad

La cancrrosis de los cítricos es una enfermedad causada por bacterias Gram-negativas fitopatógenas del género *Xanthomonas*. Es una enfermedad que afecta al género *Citrus* en todo el mundo y produce grandes daños económicos. Esta enfermedad es considerada endémica en el sudeste Asiático y se ha expandido hacia la mayoría de las zonas productoras de cítricos del mundo (Graham y col., 2004). En Sudamérica se encontró primero en Brasil, y luego en otros países incluyendo Argentina, donde la enfermedad se considera endémica desde 1990, y actualmente afecta tanto a las regiones del nordeste (NEA) como del noroeste (NOA) productoras de naranjas y mandarinas, y limones y pomelos, respectivamente. En muchos países, la enfermedad está sujeta a

estrictos programas de cuarentena y erradicación, que incluyen la remoción y destrucción de los árboles infectados y todos aquellos que están a una distancia determinada, considerados expuestos a la enfermedad (Stall y col., 1980; Graham y col., 2004). Algunas medidas preventivas de la enfermedad incluyen la aplicación de bactericidas en aerosol a base de cobre, que reduce la población bacteriana en la superficie de las hojas, y la desinfección de maquinarias y ropa de los trabajadores para evitar la dispersión de material contaminado con la bacteria a través de grandes distancias. La aparición de la enfermedad también implica una restricción del mercado y comercialización de los cítricos producidos en las zonas afectadas (Graham y col., 2004).

Existen diferentes tipos de cancrrosis, la cancrrosis tipo A o cancrrosis Asiática, que se encuentra más expandida a nivel mundial y que afecta actualmente a nuestro país, es la forma de cancrrosis más severa, alcanza a todos los tipos de cítricos, incluyendo híbridos y es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*X. citri* o *X. campestris* pv. *citri*) (Graham y col., 2004). La cancrrosis tipo B o South American canker, es causada por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* y fue aislada en algunas quintas de pomelo y limón en Argentina, Paraguay y Uruguay (Canteros, 2001). También existen la cancrrosis tipo C o Key lime canker, causada por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, la cancrrosis tipo D o Mexican bacteriosis y la cancrrosis tipo E, nursery canker o citrus bacterial spot, causada por *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Gabriel y col., 1989; Graham y col., 1990a y b; Graham y Gottwald, 1991; Canteros, 1999; Graham y col., 2004).

La enfermedad aparece durante los períodos de temperaturas elevadas y abundantes precipitaciones, que coincide con el inicio del verano (Graham y col., 2004). La temperatura óptima estimada para el establecimiento de la enfermedad es entre 20 y 30 °C (Koizumi, 1977). Durante las lluvias, los vientos dispersan la bacteria y fuerzan su ingreso a la planta a través de estomas o heridas provocadas por tormentas o insectos como el minador del citrus asiático (*Phyllocnistis citrella*). El tamaño del poro estomático, la estructura del estoma o diferencias en la formación de la cutícula de las células de la guarda (par de células epidérmicas especializadas que bordean un poro o estoma, también denominadas células oclusivas), son críticos para la resistencia a la entrada de la bacteria. Los tallos y hojas más jóvenes e inmaduros son más susceptibles a la cancrrosis ya que los estomas están más abiertos y la cutícula no ha terminado de formarse (Stall y col., 1982). Todos los cultivares de cítricos son susceptibles a la cancrrosis aunque varía el grado de sensibilidad (Gottwald y col., 2002). Se ha observado que algunas variedades de

mandarina son moderadamente resistentes, sin embargo esta resistencia no se debe a una resistencia fisiológica activa de la planta ya que no se detecta cuando los cítricos son inoculados artificialmente con la bacteria por los métodos de herida o presión. Por lo tanto, la resistencia observada a campo se relaciona con el tamaño y número de estomas abiertos disponibles que no permiten la entrada de la bacteria a la planta, y con la ausencia de brotes foliares frecuentes y abundantes (Brunings y Gabriel, 2003).

1.4.3-Síntomas de la enfermedad y ciclo de vida del patógeno

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) es el principal agente causal de la cancrrosis tipo A o cancrrosis Asiática (Graham y col., 2004). La bacteria es capaz crecer epifíticamente sobre la superficie de la planta antes de ingresar al tejido vegetal a través de estomas o heridas (figura 1.3). Xac se establece en el espacio intercelular o apoplasto vegetal, que incluyendo la pared celular, corresponde a toda el área que se encuentra fuera de la membrana plasmática a través de la cual difunden el agua y los nutrientes. A diferencia de otras bacterias del género, como *X. campestris* pv. *campestris* que ingresa a su planta hospedadora a través de heridas y se esparce sistémicamente por el xilema generando putrefacción y marchitamiento (Alvarez y col., 1994), Xac sólo produce síntomas en el sitio de ingreso a la planta hospedadora y no se vuelve sistémica.

A medida que la bacteria se multiplica en el espacio intercelular del tejido meristemático y del parénquima de hojas, tallos y frutos, induce hipertrofia (aumento del tamaño) e hiperplasia celular (aumento de las divisiones mitóticas) (Lawson y col., 1989; Duan y col., 1999). Se produce una pérdida del espacio libre intercelular que pone en contacto las paredes celulares y aumenta el ingreso de agua desde el xilema por capilaridad (Brunings y Gabriel, 2003). Además, Xac sintetiza el exopolisacárido xantano altamente higroscópico que contribuye a la hidratación de la zona infectada. Las lesiones se elevan, engrosan y oscurecen dando como resultado el cancro característico. Por último, la epidermis de la hoja se rompe como consecuencia de la hiperplasia celular inducida por el patógeno, facilitando la salida de la bacteria hacia la superficie de la planta, que eventualmente se dispersará por acción de las lluvias y vientos, comenzando nuevamente su ciclo de infección (Brunings y Gabriel, 2003) (figura 1.3). Xac es un patógeno de plantas obligado, es decir que es incapaz de sobrevivir fuera de los tejidos vegetales infectados por períodos de tiempo prolongados. Las bacterias permanecen con vida en los márgenes de las lesiones en hojas y frutos hasta que éstos caen de la planta.

En ciertos estudios, se observó que *Xac* puede sobrevivir unos pocos días sobre el suelo, y meses si se encuentra sobre hojas o frutos en descomposición (Graham y col., 1989; Graham y col., 2004). Hasta el momento, no se ha encontrado un vector específico (aparte de los seres humanos) que transporte al patógeno desde un sitio a otro. Estas evidencias confirman que *Xac* debe cumplir con su ciclo de vida dentro de la planta hospedadora hasta colonizar otro nicho, ya que de lo contrario no es capaz de sobrevivir.

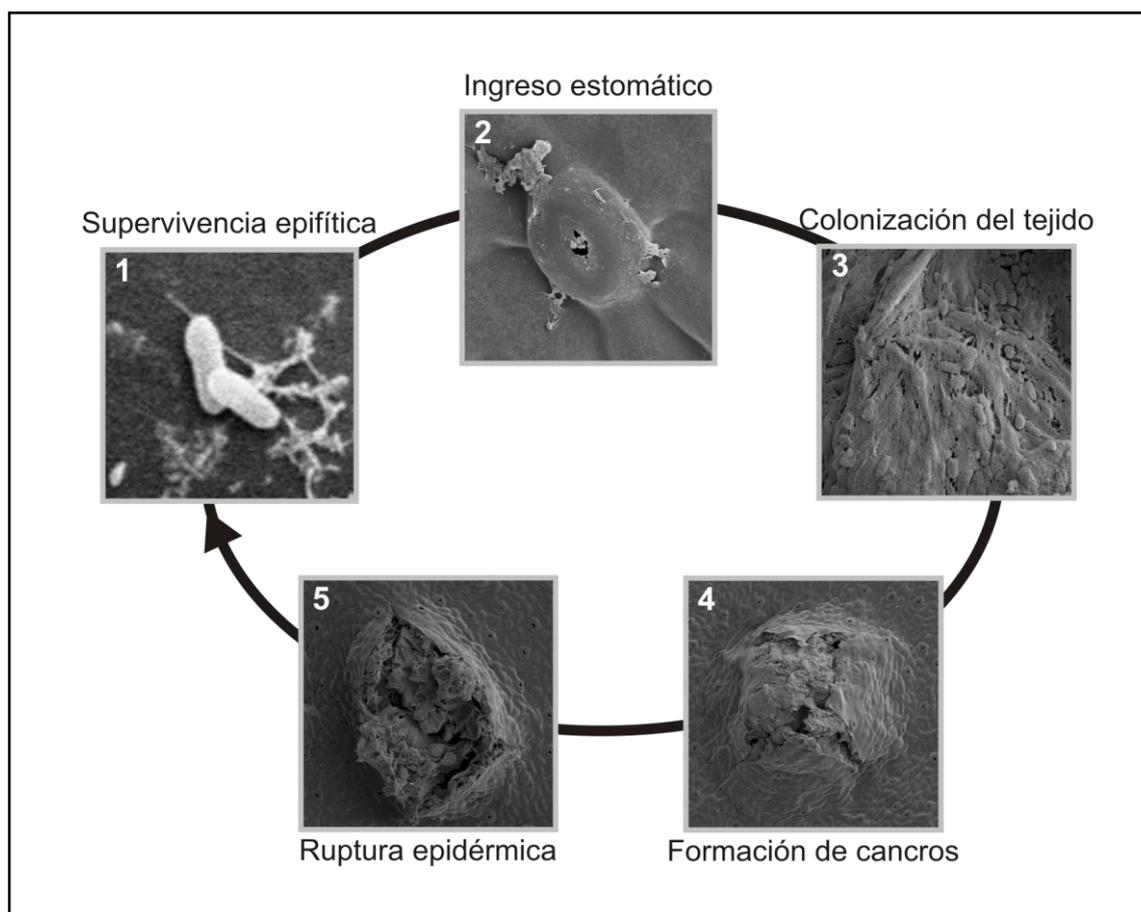


Figura 1.3. Ciclo de vida de *X. axonopodis* pv. *citri* en la canchrosia de los cítricos.

Xac infecta hojas, tallos y frutos y puede persistir epifíticamente sobre la superficie de la planta (1) antes de ingresar al tejido vegetal a través de estomas o heridas (2). Luego del crecimiento y multiplicación en el apoplasto (3) se visualiza la infección como manchas circulares que se engrosan y oscurecen formando el cancro característico (4). Finalmente la epidermis del tejido vegetal se rompe como resultado de la hiperplasia inducida por el patógeno (5) permitiendo que se liberen células bacterianas que pueden ser dispersadas luego por la lluvia y el viento hacia nuevos focos infecciosos comenzando un nuevo ciclo. Adaptado de Gottig y col., 2010.

A nivel macroscópico, los síntomas de la enfermedad se manifiestan como manchas circulares y húmedas, inicialmente en la cara abaxial de las hojas, en tallos y frutos. Luego estas manchas aumentan su tamaño y se extienden en ambas caras de las hojas, a

medida que la bacteria se multiplica en el espacio intercelular. Las manchas se transforman en ampollas que luego se convierten en pústulas esponjosas, blancas o amarillentas. Las pústulas se oscurecen y engrosan formando un cancro marrón, corchoso y rugoso al tacto (figura 1.4). Las lesiones más viejas tienen el centro hundido y, a veces, un halo clorótico amarillo alrededor. En los frutos los canchros son más profundos pero no llegan a penetrar la cáscara, aunque la muerte del tejido vegetal facilita el ingreso de hongos que aceleran el proceso de putrefacción (figura 1.4). En árboles muy infectados puede ocurrir defoliación y abscisión prematura de los frutos (Brunings y Gabriel, 2003).

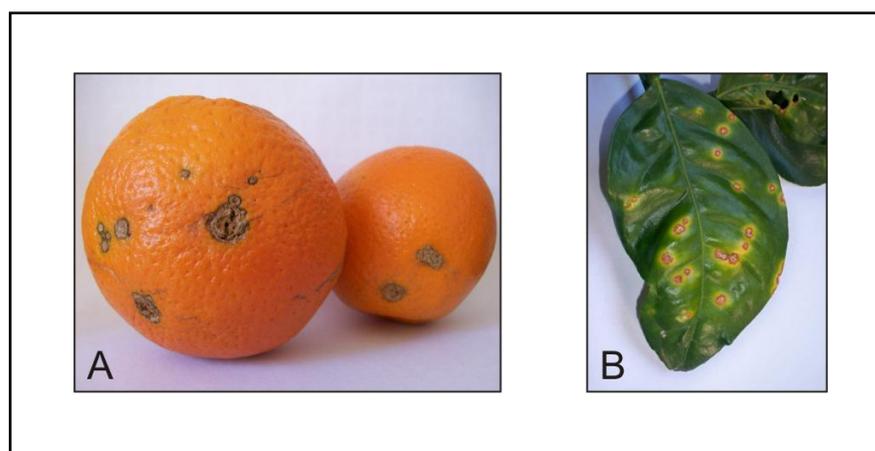


Figura 1.4. Síntomas de la canchrosis de los cítricos.

Fotografías de frutos (A) y hojas (B) de *Citrus sinensis* con lesiones de canchrosis típicas en la cáscara y la cara adaxial de la hoja. Se puede observar el cancro marrón y corchoso característico, que en las hojas está rodeado por áreas cloróticas amarillentas. Tomado de Garavaglia, 2010.

1.5-*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Características principales

El genoma de Xac fue secuenciado completamente (da Silva y col., 2002) y comprende un cromosoma circular de 5 Mpb y dos plásmidos naturales pXAC33 y pXAC64 de 33 y 64 kpb, respectivamente. La secuenciación del genoma aporta nuevas perspectivas sobre la identificación y función de genes o clusters génicos que pueden estar involucrados en la patogénesis. Los genes más relevantes identificados y caracterizados hasta el momento incluyen genes que codifican para la adhesión celular y elementos estructurales de la superficie bacteriana, sistemas de secreción de proteínas, toxinas, enzimas que degradan la pared celular vegetal y otras involucradas en la respuesta al estrés oxidativo producido en los tejidos vegetales infectados (Van Sluys y col., 2002; Astua-Monge y col., 2005; Gottig y col., 2010).

A continuación se describen algunos de los sistemas y moléculas caracterizadas en Xac en relación con la cancrrosis de los cítricos (figura 1.5), que favorecen su supervivencia y potencian la patogenicidad en plantas:

-Numerosos genes que codifican proteínas efectoras putativas se identificaron en el genoma de Xac pero unos pocos han sido caracterizados (Hajri y col., 2009). Los más estudiados pertenecen a la familia AvrBs3 que contienen repeticiones de 34 aminoácidos en su secuencia. El gen de patogenicidad más caracterizado dentro de esta familia es *pthA*, esencial para causar la enfermedad y sus síntomas. La inserción de este gen en otras Xanthomonas confiere la habilidad de generar cancrrosis en los cítricos, mientras que mutaciones del mismo impiden: que la bacteria se multiplique en la planta hospedadora, que genere humedecimiento y cancrros necróticos (Swarup y col., 1991). Además se vio que cuando *pthA* se expresa en el interior de células hospedadoras se generan los síntomas de la cancrrosis: hipertrofia, hiperplasia y muerte celular (Duan y col., 1999). En el genoma también hay otros tres alelos de *pthA*, de los cuales dos serían funcionales. PthA también produce HR en plantas no hospedadoras (Duan y col., 1999), indicando que además de ser una proteína de patogenicidad y producir enfermedad, también determina el rango de hospedador y es requerida para producir la HR (Swarup y col., 1992; Brunings y Gabriel, 2003). Otros miembros de la familia AvrBs3 que fueron caracterizados son Apl1 (Fujikawa y col., 2006), HssB3.0 (Shiotani y col., 2007) y AvrTaw (Rybak y col., 2009).

Otras proteínas putativas encontradas son AvrXacE1 y AvrXacE2 que a pesar de la baja homología que poseen con proteínas de estructura y función conocida, se agrupan con proteínas efectoras putativas de otros fitopatógenos y se han clasificado como miembros de la familia de efectores XopE (White y col., 2009). AvrXacE1 y AvrXacE2 poseen una tríada catalítica de aminoácidos cisteína, histidina y ácido aspártico, por lo que se las ha agrupado con proteínas del tipo péptido-*N*-glicanasas (PNGasas) (Nimchuk y col., 2007). También poseen motivos de *N*-miristoilación en sus regiones *N*-terminales (Thieme y col., 2007). *Xac3090* es otro gen de Xac que codifica una proteína efectora del tipo LRR y que se agrupa con efectores de la familia XopL (White y col., 2009). El motivo LRR, encontrado también en proteínas eucariotas y proteínas R, estaría involucrado en interacciones proteína-proteína (Kobe y Kajava, 2001; Jones y Dangl, 2006).

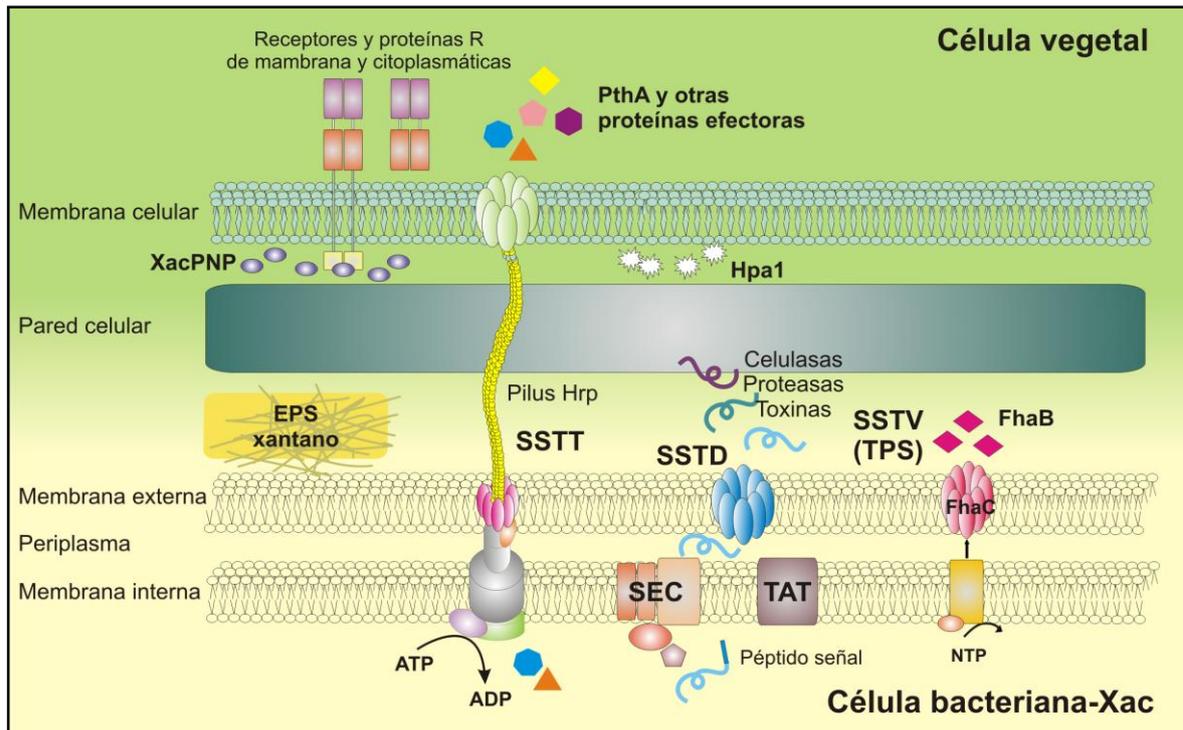


Figura 1.5. Características principales de *X. axonopodis pv. citri*.

Esquema de los mecanismos de patogenicidad más importantes de Xac que participan durante la interacción con plantas hospedadoras de citrus. Se representan el exopolisacárido (EPS) xantano, el sistema de secreción de proteínas tipo III (SSTT) encargado de translocar directamente al citoplasma vegetal proteínas efectoras como PthA. Los sistemas Sec y Tat que transportan proteasas y toxinas hacia el periplasma bacteriano para luego ser secretados por el sistema de secreción de proteínas tipo dos (SSTD); y el sistema de secreción tipo V (SSTV) que transporta la adhesina no fimbrial XacFhaB. También se representan el péptido natriurético tipo planta XacPNP, la proteína tipo hairpin Hpa1 y receptores y proteínas R de la célula vegetal.

-Al menos un homólogo al sistema de secreción de proteínas tipo V de dos componentes (TPS, por two-partner secretion) está presente en el genoma de Xac (da Silva y col., 2002) (figura 1.5). Este sistema, está compuesto por dos componentes, una proteína transportadora formadora de poros localizada en la membrana externa (TpsB) y una proteína transportada (TpsA). Las proteínas TpsA comparten una región N-terminal altamente conservada, el dominio TPS, de aproximadamente 250 residuos esenciales para la secreción a través del canal formado por la proteína TpsB (Jacob-Dubuisson y col., 2001; Clantin y col., 2004). Este sistema secreta grandes proteínas o dominios proteicos, en su mayoría adhesinas o hemolisinas, y se ha identificado en muchos géneros bacterianos, incluyendo patógenos de humanos, animales y plantas. La hemaglutinina filamentosa (FHA, del inglés filamentous hemagglutinin) del agente causal de la tos ferina *Bordetella pertussis*, FhaB, es la más caracterizada; y es secretada por FhaC que actúa

como el componente TpsB del sistema TPS (Jacob-Dubuisson y col., 1999). Existen pocos ejemplos de sus homólogos en patógenos de plantas. Xac posee un gen que codifica una hemaglutinina tipo FhaB, denominada XacFhaB que sería secretada por el componente TpsB putativo del sistema TPS, denominado XacFhaC, codificado corriente arriba del gen XacFhaB (figura 1.5). XacFhaB contiene un péptido señal seguido de un dominio TPS conservado que contiene todos los residuos del dominio TPS de *B. pertussis* que son esenciales para la secreción (Hodak y col., 2006). En el laboratorio se construyó la cepa de Xac Δ XacFhaB que mostró una deficiencia en la adhesión entre bacterias y sobre la superficie de hojas de naranja cuando se inoculó en plantas de citrus (Gottig y col., 2009a). Además, produjo lesiones más dispersas y menor número de canchales que la cepa salvaje, sugiriendo que esta proteína es crucial en los estadios iniciales del proceso de infección en los que se produce la unión de la bacteria al tejido vegetal (Gottig y col., 2009a). Por el contrario, la cepa mutante en la proteína transportadora putativa XacFhaC, posee un fenotipo de virulencia intermedio semejante a la infección con la cepa salvaje, sugiriendo que XacFhaB podría ser secretada también por otro componente aún no identificado. En resumen, esta adhesina no fimbrial es importante para las etapas iniciales del proceso infeccioso y favorece la colonización del tejido facilitando la adherencia de la bacteria a las células vegetales (Gottig y col., 2010).

-Una característica del género *Xanthomonas* es la síntesis del xantano, un exopolisacárido (EPS) ácido ramificado formado por la polimerización de unidades pentasacárido repetitivas que contienen glucosa, manosa y ácido glucurónico (Ielpi y col., 1993). Se produce comercialmente a gran escala a partir de cultivos de la especie *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) y es utilizado por sus propiedades reológicas como agente espesante en las industrias alimenticias y farmacéuticas (Katzen y col., 1998). La producción de xantano está regulada por un factor difusible llamado DSF (del inglés diffusible signal factor) derivado de ácidos grasos que actuaría como una molécula de señalización entre células. Al igual que otras bacterias patógenas, Xac regula la expresión de muchos de sus genes a través del quorum sensing; mediante sistemas transcripcionales de dos componentes percibe estímulos y moléculas de señalización difusibles y activa cascadas de transducción de señales que regulan la expresión génica (Brunings y Gabriel, 2003; Torres y col., 2007). El xantano se produce principalmente al final de la fase logarítmica y continúa durante el resto de la fase de crecimiento (Katzen y

col., 1996), y puede permanecer asociado a la célula formando una cápsula o esparcirse por el medio con una consistencia fluida (figura 1.5). Por sus propiedades hidrofílicas y aniónicas cumpliría un rol protector contra la deshidratación, permitiría concentrar nutrientes y minerales como así también reducir el contacto con moléculas hidrofóbicas o cargadas y aumentar la adhesión a superficies. El xantano es regulado por los genes *rpf* (Tang y col., 1991). Se sintetiza, polimeriza y secreta por los productos génicos del cluster *gum* y estructuralmente está compuesto por un esqueleto de (β-1,4)-D-glucosa con cadenas laterales de trisacáridos de manosa-(β-1,4)-ácido glucurónico-(β-1,2)-manosa unidos a residuos de glucosa alternados por uniones α-1,3 (Katzen y col., 1996). El cluster génico *gum* de *Xac* y *Xcc* son altamente homólogos, comprenden 16 kpb y poseen 12 marcos abiertos de lectura (*gumB* a *gumM*) que codifican las proteínas necesarias para la biosíntesis del xantano (da Silva y col., 2002; Moreira y col., 2004).

Numerosos estudios sobre el rol del EPS en la patogenicidad muestran una disminución en la virulencia de mutantes deficientes en xantano (Katzen y col., 1998; Dharmapuri y Sonti, 1999; Kemp y col., 2004; Rigano y col., 2007). Sin embargo en *Xac*, mutantes en el gen *gumD* que cataliza la primera reacción en la síntesis del xantano, son deficientes en la producción de este EPS, pero permanecen patogénicas en plantas de citrus al igual que la cepa salvaje, demostrando que en esta interacción en particular el EPS no modula la virulencia del patógeno (Dunger y col., 2007). Las mutantes Δ*gumD* mostraron una deficiencia en la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo en la fase estacionaria de crecimiento, así como en la supervivencia epifítica sobre hojas de citrus. Estos resultados sugieren que el xantano no cumple un rol esencial en la cancrrosis de los cítricos en las etapas iniciales de la infección pero facilita el mantenimiento de la bacteria sobre la planta hospedadora, posiblemente mejorando la colonización de tejidos distantes (Dunger y col., 2007).

-Los biofilms consisten en una comunidad estructurada de células bacterianas rodeadas por una matriz polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte que actuaría durante la enfermedad favoreciendo la sobrevivencia de la bacteria frente a situaciones de estrés como la deshidratación o concentraciones elevadas de compuestos antimicrobianos producidos por la planta (Dow y col., 2003). En *Xac*, el xantano y las adhesinas son necesarias para la formación de biofilms bacterianos (Monds y O'Toole, 2009). En el laboratorio se observó que la mutante Δ*XacFhaB* es incapaz de

formar biofilm y contrarresta este efecto sobreproduciendo xantano. Por otro lado, el xantano podría mantenerse en la matriz extracelular de manera adhesina-dependiente (Gottig y col., 2009a). En resumen, la adhesina XacFhaB y el EPS xantano de Xac estarían involucrados en las interacciones bacteria-bacteria necesarias para formar biofilms y para mejorar la supervivencia epifítica que facilitan la colonización de los tejidos vegetales. Estas moléculas también están involucradas en la movilidad bacteriana conduciendo a canchros más grandes en las hojas infectadas (Gottig y col., 2009a).

-En las bacterias fitopatógenas el sistema de secreción de proteínas tipo dos (SSTD) permite la secreción de celulasas, pectinasas, toxinas, fosfatasas alcalinas, xilanasas y proteasas para degradar los componentes de la pared celular del hospedador. La secreción de estas proteínas al medio extracelular consiste en un proceso de dos etapas (Finlay y Falkow, 1997; Lee y Schneewind, 2001). En la primera, las proteínas secretadas son transportadas a través de la membrana interna citoplasmática utilizando la vía *sec*-dependiente (Pugsley, 1993) o la vía *twin-arginina* (Tat) (Voulhoux y col., 2001) dependiendo de la naturaleza del péptido señal de la proteína a secretar. En la segunda etapa, las proteínas son secretadas desde el periplasma a través de la membrana externa y hacia el medio extracelular por el aparato de secreción de tipo II, cuyos componentes son codificados por aproximadamente 12 a 16 genes dependiendo del sistema. Xac posee dos agrupamientos génicos completos para el SSTD, llamados *xcs* y *xps*, además de los genes *sec* (da Silva y col., 2002) (figura 1.5). La presencia de 30 a 40 genes que potencialmente codifican enzimas que degradan la pared celular en el genoma de Xcc y de Xac es indicativo de la importancia de estos genes en la patogénesis de *Xanthomonas*. Se ha visto en diversos estudios que la actividad elicitora que inducen las enzimas que degradan la pared celular vegetal es debida a los oligosacáridos que son liberados por la acción de estas enzimas sobre la pared celular más que por las enzimas mismas.

-El sistema de secreción tipo IV (SSTC) permite la unión de la bacteria a la pared celular del hospedador por medio de un pilus o fimbria que al retraerse acerca a ambas células permitiendo la liberación de proteínas y macromoléculas bacterianas dentro del citosol de la célula hospedadora (Christie, 2001). Al igual que el SSTT (descrito más adelante) es un complejo multimérico que forma una estructura de tipo pili que puede atravesar las dos membranas celulares bacterianas e interactuar con otras células

procariotas o eucariotas liberando proteínas o ADN en el citosol celular (Ward y col., 2002). El SSTC no se encuentra ampliamente distribuido entre las bacterias Gram-negativas como otros sistemas de secreción. Xac posee dos clusters génicos que codifican componentes del SSTC, uno localizado en el plásmido pXAC64 y el otro en el cromosoma principal, aunque este último está incompleto (da Silva y col., 2002). El SSTC, también denominado “sistema de conjugación adaptado”, localizado en pXAC64 es necesario para la transferencia por conjugación de plásmidos que poseen un sitio de movilización u oriT (Alegria y col., 2005).

-Un gen particular de Xac es el que codifica para un péptido del tipo péptidos natriuréticos de planta denominado XacPNP (figura 1.5), que no se encuentra en ningún otro fitopatógeno o bacteria, al menos de los secuenciados hasta el momento (Nembaware y col., 2004). Los péptidos natriuréticos (PNs) se identificaron en numerosas especies de vertebrados donde estarían involucrados en la regulación del balance de agua y sales. En las plantas superiores, los PNP (por plant natriuretic peptide) inducen numerosas respuestas que contribuyen a la regulación de la homeostasis y el crecimiento, a través de incrementos rápidos y transientes en los niveles de GMP cíclico celular que promueven el movimiento de iones, aumentando el ingreso neto de agua dentro de las células, así como la apertura de estomas (Gehring e Irving, 2003; Ludidi y col., 2004). Los PNP se inducen en condiciones de estrés osmótico y deprivación de K^+ y se localizaron en el apoplasto vegetal y en los tejidos vasculares (Meier y col., 2008). XacPNP posee similitud de secuencia significativa e idéntica organización de dominios con PNP (Gottig y col., 2008). Una cepa mutante en XacPNP (Δ XacPNP) construida en el laboratorio, produce lesiones de cancrrosis más necróticas que la cepa salvaje lo que conduce a una temprana muerte celular bacteriana. Esto sugiere que XacPNP permite al patógeno modificar las respuestas del hospedador para crear condiciones favorables para su propia supervivencia (Gottig y col., 2008; Gottig y col., 2009b). Estudios de proteómica en hojas de citrus infectadas con Xac salvaje y Δ XacPNP mostraron que la principal diferencia de la infección entre ambas cepas se encuentra en proteínas involucradas en el metabolismo del carbono y el proceso de fotosíntesis sugiriendo que Δ XacPNP causa considerablemente una mayor reducción en la expresión de genes fotosintéticos (Garavaglia y col., 2010a). Se observó que la aplicación de la proteína XacPNP recombinante en hojas de citrus aumenta los niveles de expresión de estas proteínas

fotosintéticas además de causar respuestas fisiológicas como la apertura de estomas (Garavaglia y col., 2010b y c). Estos resultados sugieren que Xac ha adquirido y adaptado un péptido natriurético tipo planta que mimetiza su función para mantener las condiciones de la planta hospedadora de la forma más adecuada para su estilo de vida biotrófico, modulando directa o indirectamente la función de los cloroplastos; XacPNP probablemente actúa frente a las respuestas de defensa de la planta hospedadora contrarrestando la disminución de la fotosíntesis.

-Recientemente en el laboratorio se ha caracterizado un gen perteneciente al cluster *hrp* que codifica una proteína de tipo hairpin denominada Hpa1 (figura 1.5). Las proteínas hairpin son secretadas por el SSTT, no poseen péptido señal N-terminal, son ricas en glicina y no poseen residuos de cisteína (Alfano y Collmer, 1997). Son capaces de elicitar respuestas de defensa y HR en plantas pero no se consideran proteínas efectoras. En *Xanthomonas*, la familia Hpa1/HpaG es capaz de inducir HR (Kim y col., 2003). Se observó que Hpa1 de Xac produce respuesta HR en plantas no hospedadoras de tabaco, pimiento y *Arabidopsis*, mientras que en plantas hospedadoras de naranja produjo una respuesta de defensa débil sin fenotipo visible (Sgro y col., 2012). Una cepa mutante en *hpa1* produjo menor número de canchros que la cepa salvaje de Xac en hojas de citrus. La ausencia de Hpa1 también dificultó la agregación bacteriana en solución e *in planta*. A pesar de que Hpa1 induce respuestas de defensa en plantas no hospedadoras y en menor grado, en plantas hospedadoras, el rol principal en la canchrosis de los cítricos radicaría en la alteración de la estructura del mesófilo del tejido vegetal y en el agregado de las células bacterianas, por lo tanto incrementando la virulencia y patogenicidad (Sgro y col., 2012).

1.6-Sistema de secreción de proteínas tipo III

1.6.1-Características generales

Al igual que diversos patógenos de animales como *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* spp. que transfieren proteínas efectoras directamente en el interior de las células animales a través del SSTT, los patógenos de planta también utilizan este sistema para translocar proteínas efectoras y otros elicitors en el citoplasma de las células vegetales (Alfano y Collmer, 1997). Xac, al igual que otros patógenos Gram-negativos, utiliza el SSTT para transportar proteínas efectoras al interior de la célula eucariota hospedadora. El

cluster que codifica el SSTT se denomina *hrp* (por respuesta HR y patogenicidad) porque es esencial para la patogenicidad y virulencia en plantas hospedadoras y para el desencadenamiento de la respuesta HR en plantas resistentes y no hospedadoras (Lindgren y col., 1986; Bonas y col., 1991; Alfano y Collmer, 1997; Büttner y Bonas, 2002; Dunger y col., 2005; Büttner y He, 2009). Bacterias mutantes en este sistema de secreción no son capaces de multiplicarse en los tejidos vegetales de plantas hospedadoras, lo que impide la colonización de la planta y la posterior dispersión del patógeno, así como tampoco son capaces de producir respuesta HR en plantas hospedadoras resistentes o plantas no hospedadoras, este fenotipo, producto de la mutación en uno o varios genes *hrp*, se conoce como “fenotipo *hrp*” (Alfano y Collmer, 1997). El SSTT se encuentra conservado en bacterias patogénicas de plantas y animales (Büttner y Bonas, 2002; Hueck, 1998) y se diferencia de otros sistemas de secreción porque las proteínas secretadas no poseen péptido señal *N*-terminal procesable; la secreción no es sec-dependiente; requieren de proteínas chaperonas para la secreción de algunas de las proteínas y del contacto con la célula hospedadora para la activación total del sistema de secreción (Hueck, 1998).

1.6.2-Cluster génico *hrp* en bacterias fitopatógenas

El SSTT es codificado por el regulón *hrp* que incluye genes regulatorios, componentes efectores y estructurales del aparato de secreción y otros genes asociados (Alfano y Collmer, 1997). Los genes *hrp* y *hrc* (por *hrp* conservados) se han caracterizado principalmente en 4 especies de patógenos de plantas Gram-negativos representativos: *P. syringae* (que produce enfermedad en poroto), *Erwinia amylovora* (que afecta manzanas y peras), *Ralstonia solanacearum* (que ocasiona marchitamiento en tomate) y *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (que produce la mancha bacteriana en tomate y pimiento) (Boucher y col., 1987; Steinberger y Beer, 1988; Arlat y col., 1991; Bonas y col., 1991; Galán y Wolf-Watz, 2006). En estas bacterias los genes *hrp* se encuentran agrupados en clusters de aproximadamente 25 kpb en el cromosoma (Alfano y Collmer, 1997) y se clasificaron en dos grupos de acuerdo a la similitud en los genes, la estructura de los operones y los sistemas regulatorios (Alfano y Collmer, 1996). Los clusters *hrp* de *P. syringae* y *E. amylovora* pertenecen al grupo I, y los clusters *hrp* de *R. solanacearum* y *X. campestris* al grupo II. La principal diferencia entre los grupos I y II radica en la regulación de los clusters. En el grupo I los genes están regulados por la proteína HrpL (Xiao y col.,

1994; Wei y Beer, 1995), un miembro de la subfamilia ECF (función extracitoplasmática) de factores sigma; que a su vez se encuentra bajo el control del sistema de dos componentes HrpX/HrpY (Wei y col., 2000). En el grupo II, los operones se activan por una proteína de la familia AraC de activadores transcripcionales, denominada HrpB en *R. solanacearum* y HrpX en *Xcv* (Wengelnik y Bonas, 1996; Alfano y Collmer, 1997; Vasse y col., 2000; Noël y col., 2001), que a su vez son activadas por el regulador de respuesta HrpG (Wengelnik y col., 1996b; Brito y col., 1999). A pesar de estas diferencias, los genes *hrp* de ambos grupos generalmente están reprimidos en medios de cultivo ricos o complejos y se expresan *in planta* y en medios de cultivos que mimetizan los fluidos intercelulares vegetales (Bonas, 1994). En general, los genes involucrados en la virulencia bacteriana se localizan en regiones del genoma que muestran características de islas de patogenicidad, es decir, regiones flanqueadas por repeticiones directas, elementos con secuencias de inserción (IS), genes que codifican ARNt, integrasas o transposasas (Hacker y Kaper, 2000). También, pueden presentar diferencias en el contenido de guaninas y citosinas (G+C) que es indicativo de una transferencia génica horizontal. Muchos de los clusters *hrp* caracterizados se encuentran en regiones genómicas con características de islas de patogenicidad, ya sea en el cromosoma principal o en plásmidos movilizables (Alfano y col., 2000).

Los clusters *hrp* de muchas bacterias fitopatógenas han sido secuenciados y caracterizados, y dentro del género *Xanthomonas* se conocen algunos como el de *Xcv*, *Xac*, *Xoo* y *X. axonopodis* pv. *glycines* (Büttner y Bonas, 2002; da Silva y col., 2002; Kim y col., 2003; Zhu y col., 2000). El cluster *hrp* de *Xcv* es el más estudiado hasta el momento y sirve como modelo para el estudio de este aparato de secreción en otras *Xanthomonas* (figura 1.6B) (Wengelnik y col., 1996b; Rossier y col., 2000). Comprende una región de 23 kpb y seis operones, *hrpA-hrpF* (Noël y col., 2002; Weber y col., 2005). De las 22 proteínas codificadas por estos genes, 9 son genes *hrc* conservados y al igual que en otras bacterias constituyen el centro del translocón tipo III. El cluster *hrp* de *Xcv* es parte de una isla de patogenicidad (Büttner y Bonas, 2002; Thieme y col., 2005) y además codifica proteínas del tipo Hpa (por *hrp* asociadas) que no son esenciales para la inducción de respuesta HR en interacciones incompatibles, pero tienen un rol importante en la patogenicidad. Por ejemplo mutantes en la proteína HpaA de *Xcv*, codificada en el operón *hrpD* y rodeada por verdaderos genes *hrp*, no pueden crecer o producir síntomas de enfermedad en plantas susceptibles, pero todavía son capaces de inducir respuesta HR en plantas

resistentes a pesar de que la reacción es parcial (Bonas y col., 2000). En Xcv el cluster también contiene la secuencia codificante de algunas proteínas efectoras como XopD, que en general se encuentran en otras regiones del genoma (figura 1.6B).

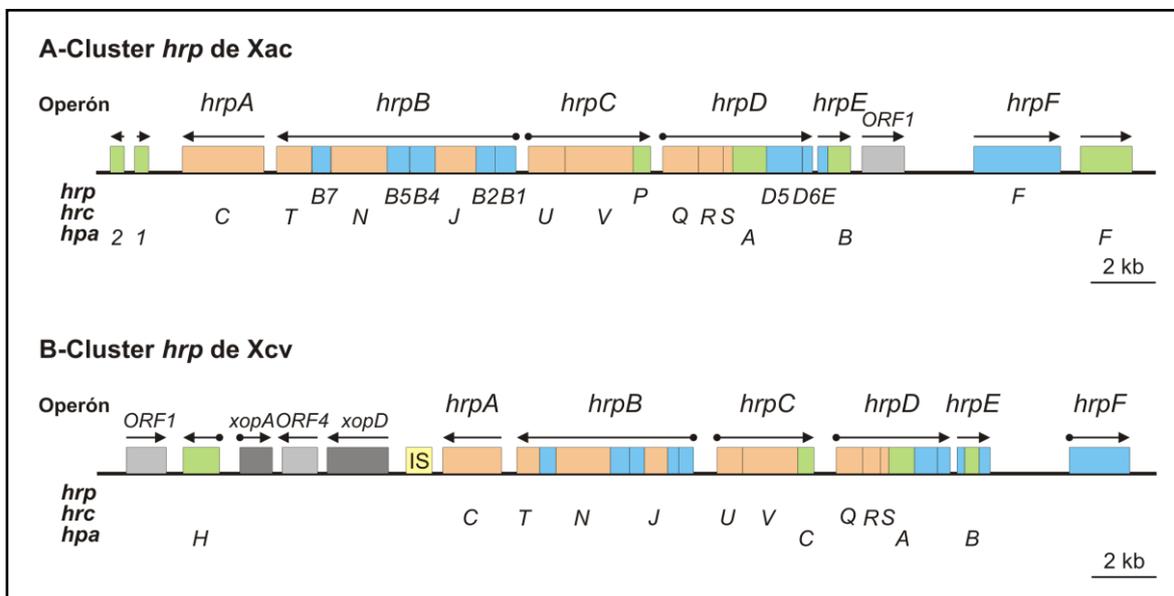


Figura 1.6. Cluster *hrp* en Xanthomonas.

Esquema de las regiones genómicas que contienen a los clusters *hrp* de *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) (A) y *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (B). Los rectángulos de colores corresponden a marcos abiertos de lectura (ORF), las flechas indican la orientación de los operones *hrp*, y los puntos corresponden a cajas PIP en las regiones promotoras de los genes u operones. En la parte superior de los esquemas se indican los nombres de los operones y en la parte inferior se indican los nombres de los genes *hrp*, *hrc* y *hpa*, respectivamente. IS: secuencia de inserción. Las barras indican 2 kb de longitud. Adaptado de Dunger y col., 2005 y Büttner y Bonas, 2002.

El número y la organización de los genes en los cluster *hrp* de Xac y Xcv están altamente conservados entre los dos patógenos (Thieme y col., 2005; da Silva y col., 2002). El cluster *hrp* de Xac abarca una región de más de 23 kpb y codifica 25 genes, desde *hpa2* hasta *hpaF* (figura 1.6A) (da Silva y col., 2002). También contiene los nueve genes *hrc* conservados y genes que contribuyen en la interacción con la planta llamados genes *hpa* (*hrp*-associated) como la proteína tipo hairpin Hpa1, descrita anteriormente (Sgro y col., 2012). El cluster *hrp* de Xac es parte de una isla de patogenicidad debido a que tiene distinto contenido de G+C respecto del resto del genoma e incluye elementos genéticos movilizables como transposasas (Brunings y Gabriel, 2003). En el laboratorio se demostró que varios genes *hrc* y *hrp* de Xac (por ejemplo: *hrcN*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS* y *hrpF*) son necesarios para la patogenicidad en plantas de cítricos, lo que confirma la importancia del SSTT en la interacción Xac-cítricos (Dunger y col., 2005). Además, se

construyó una mutante de Xac en el operón *hrpB*, y se demostró que la región *hrp* mutada es esencial para la patogenicidad en hojas de cítricos ya que un mes después de la inoculación con altas concentraciones de bacteria (10^7 UFC/ml) no se observó el fenotipo de la cancrrosis, ni crecimiento bacteriano sobre las hojas (Dunger y col., 2005). Cuando la mutante es infiltrada en hojas de plantas no hospedadoras tampoco se observa HR. Estos resultados indican que el sistema de secreción tipo III y en particular el operón *hrpB*, es esencial para la patogenicidad de Xac en plantas hospedadoras y para inducir la respuesta hipersensible (HR) en plantas no hospedadoras (Dunger y col., 2005). Mutantes de Xcv en los genes del operón *hrpB* mostraron el mismo fenotipo, indicando que también son componentes esenciales del SSTT para la patogenicidad y virulencia de esta bacteria (Rossier y col., 2000). Estos fenotipos probablemente se deben a que las bacterias mutantes no pueden introducir las proteínas efectoras y otras moléculas elicitoras, como PthA de Xac, en las células vegetales.

1.6.3-Estructura de la maquinaria de secreción

El SSTT es una maquinaria nanomolecular compleja formada por más de 20 componentes proteicos (Büttner, 2012). El complejo de secreción transmembrana está asociado a un apéndice filamentosos extracelular denominado pilus que serviría como canal para el transporte de las proteínas efectoras bacterianas que son secretadas al interior de la planta hospedadora (Weber y col., 2005; Galán y Wolf-Watz, 2006; Büttner y He, 2009). En conjunto la estructura del inyectisoma del SSTT es similar a la del flagelo, formado por un cuerpo basal que atraviesa la membrana interna y externa bacteriana que estabiliza toda la estructura y permite el anclaje del pilus extracelular, hueco y tubular, de distinta composición y longitud dependiendo de la especie (figura 1.7) (Galán y Collmer, 1999; Erhardt y col., 2010). Debido a la compleja arquitectura que presenta el SSTT se asume que el ensamblado del mismo ocurre de manera jerárquica y que los componentes extracelulares se secretan antes que las proteínas efectoras (Büttner, 2012). Algunas bacterias poseen más de un SSTT, aunque todavía no está claro si todos son funcionales o participan de interacciones con distintos hospedadores. El SSTT también se encontró en bacterias no patogénicas o simbiotes, aunque tampoco se conoce el rol que cumple en estas interacciones (Büttner, 2012).

Durante las últimas dos décadas se construyeron mutantes no polares en casi todos los genes del cluster *hrp* de *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *syringae* y *E. amylovora*, a fin

de comprender el rol de cada uno de ellos y el funcionamiento del SSTT. De estos estudios surge que el aparato de secreción requiere 9 genes altamente homólogos y conservados entre bacterias patógenas de plantas y animales que codifican las proteínas que componen el centro del aparato de secreción en la membrana interna y externa bacteriana. Estos genes son denominados *hrc* (por *hrp* conservados) (Alfano y Collmer, 1997; Tampakaki y col., 2004). Las estructuras de la membrana interna y externa estarían unidas por una estructura central periplasmática con forma de varilla. Este “core” del SSTT estaría compuesto por 13 proteínas donde todas menos 2 parecen estar ampliamente conservadas. Comparaciones de secuencia muestran que todas las proteínas Hrc excepto HrcC, tienen homólogos involucrados en el transporte específico del flagelo o en etapas tempranas de la biogénesis del flagelo. En todos los clusters *hrp*, los 6 genes *hrc* predichos que codifican un sistema derivado del flagelo para la translocación sec-independiente a través de la membrana interna (*hrcN*, *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU* y *hrcV*) están en operones distintos de aquel que contiene el gen *hrcC* que media la translocación de proteínas a través de la membrana externa (figura 1.7). HrcC es miembro de la superfamilia de proteínas de membrana externa PulD/pIV, involucradas en la secreción tipo II (PulD) y secreción de fagos filamentosos (pIV) (Genin y Boucher, 1994). Estas proteínas forman homomultímeros en la membrana externa que permiten la salida de proteínas o fagos e inducen el operón *psp* (del inglés phage shock protein). HrcC de *Xcv* también induce este operón, implicando que la vía tipo III también utiliza un multímero formador de un canal en la membrana externa (Wengelnik y col., 1996a). Una mutante de *P. syringae* pv *syringae* en *hrcC* acumula en el periplasma parte de la proteína haripin HrpZ que normalmente es secretada, y mutantes en *hrcU* acumulan la proteína exclusivamente en el citoplasma (Charkowski y col., 1997), mostrando que HrcU se localiza en membrana interna y HrcC en la membrana externa (figura 1.7).

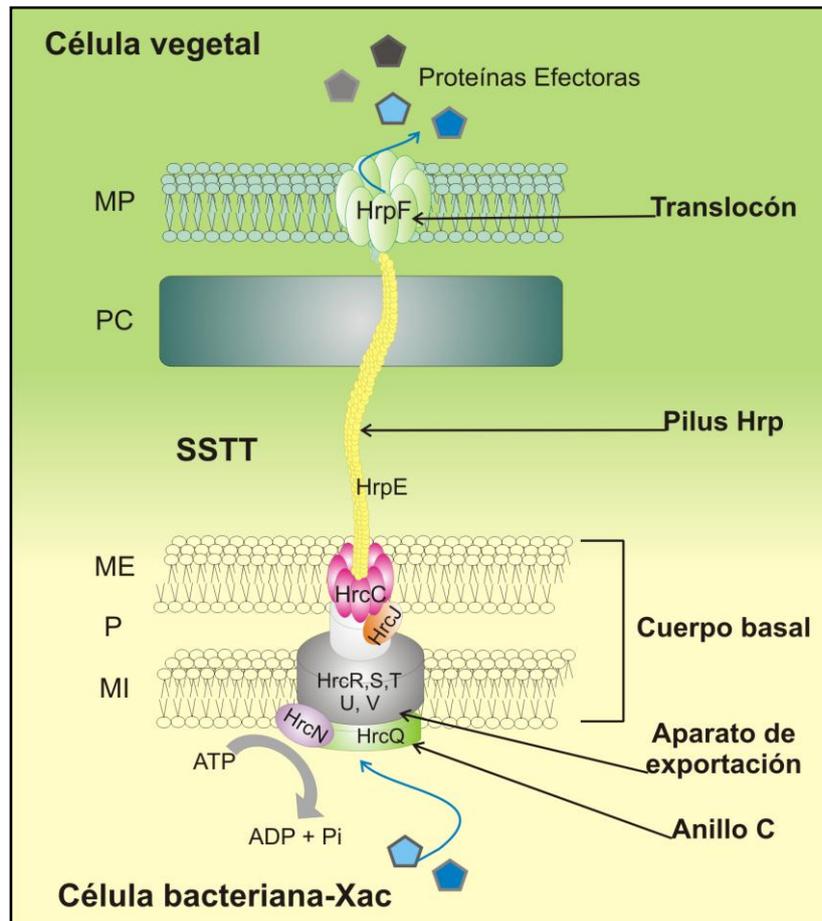


Figura 1.7. Estructura y componentes principales de la maquinaria del SSTT.

En este esquema se representa la estructura del SSTT y las proteínas principales que componen los anillos del sistema de secreción localizados en la membrana interna y externa bacteriana, y la estructura filamentosa o pilus Hrp que se extiende desde la superficie bacteriana hasta alcanzar la célula hospedadora donde a través de la proteína formadora de poros HrpF, se crea un canal a través de la membrana citoplasmática vegetal para permitir la translocación de proteínas efectoras. MP: membrana plasmática, PC: pared celular, ME: membrana externa bacteriana, P: periplasma, MI: membrana interna bacteriana. Adaptado de Dunger, 2007.

Hasta el momento no se ha purificado la estructura supramolecular completa del SSTT de bacterias patógenas de plantas, sin embargo el pilus Hrp se ha caracterizado en la mayoría de los patógenos que poseen un SSTT activo (Roine y col., 1997; Van Gijsegem y col., 2000; Jin y col., 2001; Weber y col., 2005; Büttner y He, 2009). Las secuencias de aminoácidos de la subunidad constitutiva del pilus Hrp de distintas especies es hipervariable, pero la estructura secundaria de todas ellas es similar y consiste en estructuras de tipo α -hélices (Lee y col., 2005a; Weber y Koebnik, 2005), sugiriendo que el pilus está constantemente evolucionando para evadir el sistema de vigilancia y defensa de la planta (Büttner y He, 2009). En *Xanthomonas* la proteína HrpE es el principal constituyente estructural del pilus Hrp (figura 1.7). El mayor desafío para el pilus es

atravesar la pared celular vegetal rígida (Roine y col., 1997; Van Gijsegem y col., 2000) y permitir la secreción de la proteína translocadora que se inserta en la membrana plasmática de las células vegetales. En *Xcv* se identificó la proteína translocadora HrpF, donde se observó que la secreción de esta proteína es esencial para la translocación de proteínas efectoras y además induce la formación de canales de iones en bicapas lipídicas artificiales, sugiriendo que es el componente del canal de translocación (figura 1.7) (Büttner y col., 2002). Muchos SSTT secretan proteínas extracelulares del tipo hairpins (Wei y col., 1992; He y col., 1993; Arlat y col., 1994), ricas en glicina y estables al calor, capaces de inducir respuestas de defensa en las plantas cuando se inoculan en el apoplasto vegetal en altas concentraciones (He y col., 2004). Evidencias recientes sugieren que estas proteínas podrían ser importantes para la translocación de proteínas efectoras (Kvitko y col., 2007).

La proteína HrpB2 es esencial para la formación del pilus Hrp e interacciona con HpaC y el extremo C-terminal de HrcU, que a su vez pueden interaccionar entre sí. Las evidencias sugieren que la interacción HrcU-HrpB2 es necesaria para la secreción eficiente de HrpB2. La función de HpaC sería determinar la especificidad de sustrato entre la secreción de HrpB2 y la secreción de proteínas efectoras. HpaC probablemente interacciona e induce un cambio conformacional en el dominio C-terminal de HrcU, que actuaría como un sitio aceptor de sustratos del SSTT (Weber y col., 2005; Lorenz y col., 2008; Lorenz y Büttner, 2011; Schulz y Büttner, 2011). También se vio interacción de HrcU de *Xcv* y *P. syringae* con proteínas secretadas (Lorenz y col., 2008; Büttner, 2012).

Todos los SSTT caracterizados tienen una ATPasa de membrana interna citoplasmática (HrcN) (figura 1.7) con similitud de secuencia a la subunidad β catalítica de la ATPasa F1 mitocondrial. La ATPasa F1 es un heterohexámero entre subunidades α y β que forman un canal central (Abrahams y col., 1994). Sin embargo, en el SSTT no se encontró una subunidad similar a la subunidad α . Pozidis y col. (2003) observaron que la ATPasa HrcN de *P. syringae* se activa por homo-oligomerización y está asociada periféricamente a la membrana plasmática. En *Xcv* se observó que HrcN interacciona con numerosas proteínas citoplasmáticas y de membrana interna como HpaC y la chaperona HpaB (Lorenz y Büttner, 2009). La ATPasa del SSTT aportaría la energía necesaria para el proceso de secreción y sería importante para desplegar y unir los efectores que van a ser translocados hacia la célula vegetal (Lorenz y Büttner, 2009). La estructura citoplasmática denominada anillo C y formada por proteínas de la familia YscQ como HrcQ, interaccionan

con proteínas efectoras y chaperones y podría actuar como un reclutador de proteínas a ser secretadas. Las proteínas secretadas por este sistema no poseen péptidos señal *N*-terminal conservados pero en general poseen una composición aminoacídica similar y una estructura terciaria desordenada que permitiría el reconocimiento de las proteínas a través del anillo C y la ATPasa (Büttner, 2012).

1.6.4-Regulación del cluster *hrp* en *Xanthomonas*

Los patrones de expresión de los genes *hrp* en los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Xanthomonas* son muy similares, estos genes son reprimidos cuando las bacterias crecen en medio de cultivo rico, pero se inducen a altos niveles cuando se encuentran en el apoplasto de plantas o en íntimo contacto con células de la planta (Schulte y Bonas, 1992a y b; Alfano y Collmer, 1997; Wengelnik y Bonas, 1996). Los genes *hrp* se inducen en etapas tempranas luego del contacto con el hospedador. En *P. syringae*, se detectó la expresión *in planta* de los genes *hrp* luego de 1 h post inoculación y continuó aumentando por al menos 6 hs luego del contacto inicial (Rahme y col., 1992). Existen inductores no específicos de la expresión de los genes *hrp* que se encontraron *in planta* que están siendo caracterizados, pero aún no es clara la naturaleza de la señal inductora. Cuando se percibe un estímulo se activa una cascada de proteínas reguladoras, que mediante uno o varios factores de transcripción específicos regulan finalmente la expresión de los genes del cluster (Hueck, 1998) (figura 1.8). Los genes del SSTT también se inducen en medios de cultivo mínimos, de composición variable según la especie o patovar bacteriano, como el medio XVM2 utilizado en *Xcv* y *Xac* (Wengelnik y col., 1996a; Bonas, 1994; Wei y col., 1992; Schulte y Bonas, 1992a y b). Diversas condiciones ambientales también influyen en la expresión de los genes *hrp* durante una infección (Tang y col., 2006).

La expresión génica del SSTT está regulada a nivel transcripcional y post-traducciona (Schulte y Bonas, 1992b). En *Xac* y *Xcv*, están involucradas dos proteínas regulatorias, *HrpG* y *HrpX*. A diferencia de lo que sucede en bacterias como *E. amylovora* (Wei y Beer, 1995), *P. syringae* (Grimm y Panopoulos, 1989; Xiao y col., 1994) y *R. solanacearum* (Genin y col., 1992), los genes regulatorios de *Xac* y *Xcv* están localizados fuera del operón *hrp* y sus regiones flanqueantes (aproximadamente a 1 Mpb) (Wengelnik y col., 1996b). Los genes *hrpG* y *hrpX* están próximos entre sí y se transcriben en direcciones opuestas.

En *Xcv*, la expresión de los genes *hrp* se ha estudiado intensamente usando mutantes génicas y fusiones transcripcionales de los genes *hrp* y sus promotores al gen reportero *gusA*, y se observó que se inducen *in planta*, en medio condicionado de tomate (TCM) (Schulte y Bonas, 1992b) y en medio mínimo sintético XVM2 (Wengelnik y col., 1996b). La expresión está reprimida en medio complejo excepto la del gen *hrpE* que tiene un nivel basal de expresión pero luego aumenta cuando se crecen las bacterias en medio XVM2 (Wengelnik y Bonas, 1996). HrpX es una proteína con homología a activadores transcripcionales de la familia AraC/XylS y se observó que es indispensable para la activación transcripcional de los cinco loci *hrpB* a *hrpF* en *Xcv*, mientras que la expresión de *hrpA* y *hrpX* es independiente de HrpX, indicando la presencia de otro gen regulatorio, descubierto más tarde y denominado HrpG (Wengelnik y col., 1996b; Wengelnik y Bonas, 1996). HrpX de *Xcv* se une a elementos regulatorios en *cis* conservados denominados cajas promotoras inducibles en planta (cajas PIP) con la secuencia consenso TTCGC-N₁₅-TTCGC, que están presentes en las regiones promotoras de los genes *hrp* activados por HrpX. Otros genes activados por HrpX poseen cajas PIP imperfectas (que difieren en la longitud del motivo N₁₅) y un motivo promotor -10 (Koebnik y col., 2006). Las regiones promotoras de varios genes de *Xanthomonas* identificados y algunos de los genes *hrp* presentan secuencias motivo del tipo caja PIP (promotor inducible en plantas). El homólogo de HrpX en *R. solanacearum*, HrpB, es similar a nivel de aminoácidos pero existen algunas diferencias en la regulación mediada por estas proteínas. Por ejemplo, HrpB de *R. solanacearum* está parcialmente autorregulado (Genin y col., 1992) y el gen *hrpA1* se co-transcribe con *hrpB* por lo que su expresión depende de HrpB; mientras que en *Xcv* HrpX no se autorregula y no controla la expresión de *hrpA* (Wengelnik y Bonas, 1996).

El gen *hrpG* codifica un activador transcripcional perteneciente a la familia OmpR, con elevada similitud de secuencia con reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes bacterianos. Mediante la construcción de mutantes génicas y fusiones transcripcionales en *Xcv*, se determinó que *hrpG* es esencial para la activación de los 7 loci de *hrpA* a *hrpF* y del gen *hrpX*, sugiriendo que es el primer gen de la cascada regulatoria (Wengelnik y col., 1996b). HrpG es activador transcripcional de *hrpX* y *hrpA*; y además se observó que regula negativamente su propia transcripción. Utilizando sistemas de dos híbridos en levaduras, se observó que HrpG de *Xac* interacciona con un sensor quinasa de un sistema de dos componentes y otras proteínas bacterianas de función desconocida

(Alegria y col., 2004). Si bien no es claro si este sensor quinasa tiene la capacidad de fosforilar el dominio receptor de HrpG o si la fosforilación de HrpG es importante para el correcto funcionamiento de la proteína, por diversos estudios con mutaciones puntuales en *hrpG* de *Xcv* se ha sugerido que los cambios conformacionales en la proteína tienen un rol importante en la regulación del SSTT (Wengelnik y col., 1999). La proteína HrpG, en muchos casos por medio de HrpX, controla también la expresión de proteínas efectoras y otros factores de virulencia (Astua-Monge y col., 2005; Noël y col., 2001; Noël y col., 2002).

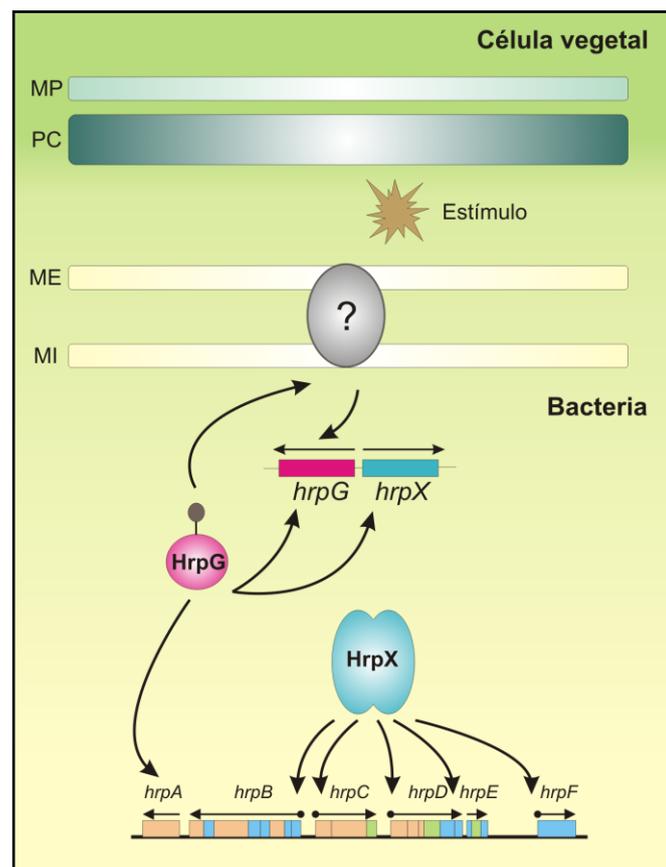


Figura 1.8. Modelo de regulación del cluster *hrp*.

Modelo propuesto en *X. campestris* pv. *vesicatoria* para la regulación del cluster *hrp* mediante las proteínas regulatorias HrpG y HrpX. MP: membrana plasmática de la célula vegetal; PC: pared celular vegetal; ME: membrana externa bacteriana; MI: membrana interna bacteriana. Adaptado de Wengelnik y col., 1996b.

HrpG es homóloga a proteínas HrpG de otras *Xanthomonas* y a proteínas reguladoras de respuesta de la familia OmpR. Está más relacionada con la proteína ChvI de *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium* spp., TctD de *Salmonella typhimurium* y proteínas PhoB de *Escherichia coli* (Makino y col., 1986), *Shigella flexneri*, *Rhizobium meliloti* y *Klebsiella oxytoca* (Wengelnik y col., 1996b). La conservación de secuencia entre

estas proteínas es significativamente mayor en el extremo C-terminal. En su extremo N-terminal contienen residuos de aminoácidos conservados que se encuentran en la proteína reguladora de quimiotaxis CheY, y que formarían una estructura terciaria involucrada en la fosforilación y activación de la proteína. El extremo C-terminal posee residuos conservados con miembros de la familia OmpR que forman el motivo de unión al ADN. Este motivo pertenece a la familia de factores de transcripción del tipo hélice-giro-hélice (HTH, hélix-turn-helix) y se denomina HTH doble alado (wHTH, winged HTH) que se caracteriza por tener uno o dos motivos de láminas β (las "alas") flanqueando el motivo HTH (Kenney, 2002). En *Xcv*, la expresión de *hrpG* es baja en medio rico, aumenta 4 veces en medio mínimo XVM2, y es independiente de cualquier otro loci *hrp* (Wengelnik y col., 1996b).

En *Xcv* se ha propuesto un modelo regulatorio de los genes del cluster *hrp*, en el cual HrpG es uno de los dos componentes de un sistema regulatorio y actuaría junto a otro componente aún no identificado que probablemente esté asociado a la membrana interna citoplasmática para percibir estímulos externos inductores del SSTT y fosforilar a HrpG en un residuo de ácido aspártico (figura 1.8). De acuerdo a este modelo, HrpG regularía positivamente la expresión del gen *hrpX* y el locus *hrpA*, mientras que reprimiría su propia transcripción. HrpX luego activaría la transcripción de los loci *hrpB* a *hrpF* en forma de homodímero (Wengelnik y col., 1996b). En este modelo aún no se conoce una proteína asociada o no a las membranas bacterianas que perciba la señal externa para activar el cluster, y tampoco se conoce la naturaleza del estímulo externo. La regulación de HrpG también se desconoce tanto a nivel transcripcional como post-traducciona, es decir si es capaz de fosforilarse para adoptar un estado activo, si forma homodímeros y cómo se une a las regiones promotoras de los genes que regula.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1-Objetivos generales

El objetivo general del presente trabajo de tesis es el estudio de genes bacterianos involucrados en la interacción planta-patógeno que resulta en la enfermedad cancrrosis de los cítricos, causada por el fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac). Se propone estudiar diferentes proteínas efectoras de Xac a fin de elucidar los mecanismos moleculares que posibilitan la interacción compatible con plantas hospedadoras; y el estudio de la proteína HrpG como reguladora del SSTT que es esencial para la translocación de proteínas y moléculas efectoras directamente en el interior de la célula vegetal contribuyendo a la virulencia y patogenicidad de Xac.

2.2-Objetivos específicos

Según el objetivo general planteado se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Continuar el estudio de las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 iniciado previamente en el laboratorio mediante la complementación de cepas mutantes de Xac en los genes codificantes de dichas proteínas efectoras, la construcción de una cepa doble mutante Δ avrXacE1/E2 y su caracterización durante la cancrrosis de los cítricos.
- Analizar la localización subcelular de las proteínas efectoras bacterianas AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 en células vegetales a fin de dilucidar el rol que cumplen dentro de la planta hospedadora.
- Construir una cepa de Xac sobreexpresante del regulador HrpG y una cepa mutante en el gen *hrpG*. Estudiar la patogenicidad y virulencia de las cepas construidas en la interacción con plantas hospedadoras y no hospedadoras.
- Evaluar la secreción de diversos factores de virulencia, la movilidad bacteriana y la expresión génica en las cepas de Xac relacionadas con el regulador HrpG.
- Obtener la proteína HrpG recombinante y caracterizar molecularmente su función regulatoria mediante el análisis de su unión a secuencias promotoras de genes del cluster *hrp*.

MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-Cultivos bacterianos y vectores

3.1.1-Cepas

Las cepas de *Escherichia coli*, *Xanthomonas* y *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas en este trabajo de tesis se detallan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cepas bacterianas.

	Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia Coli</i>	JM109 ^a	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsd R17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F ⁻ [traD36 proA ⁺ proB ⁺ lacI ^q ΔlacZ M15]	Yanish-Perron y col., 1985
	DH5α	F ⁻ reaA1 φ80d lacZΔM15 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 deoR ΔlacZY A-argF) U169	Bethesda Research Laboratories
	BL21 (DE3) pLys S ^{-b}	F- dcm ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal1 lon λ(DE3) pLysS, Cln ^r	NOVAGEN
	BLR ^b	BL21(DE3) recA ⁻ (F- dcm ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal1 lon λ(DE3)) Δ(srl-recA)306::Tn10), Tc ^r	NOVAGEN
	S17-1	294::[RP4-2-(Tc::Mu) (Km::Tn7) pro res ΔrecA, Tp ^r , mod ⁺	de Lorenzo y Timmis, 1994
<i>Xanthomonas</i>	Xacwt (Xcc99-1330)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , cepa salvaje, Ap ^r	Canteros, 1999 (INTA Bella Vista)
	XacΔhrpB	mutante <i>hrpB</i> de Xcc99-1330, Ap ^r , Km ^r .	Dunger y col., 2005
	XacΔavrXacE1	mutante <i>avrXacE1</i> de Xcc99-1330, Ap ^r , Sp ^r , Sm ^r .	Dunger y col., 2012
	XacΔavrXacE2	mutante <i>avrXacE2</i> de Xcc99-1330, Ap ^r , Gm ^r .	Dunger y col., 2012
	XacΔxac3090	mutante <i>Xac3090</i> de Xcc99-1330, Ap ^r , Gm ^r .	Dunger y col., 2012

XacΔavrXacE1/E2	mutante doble <i>avrXacE1</i> y <i>avrXacE2</i> de Xcc99-1330, Ap ^r , Sp ^r , Sm ^r , Gm ^r .	Este trabajo
XacΔavrXacE1c	XacΔavrXacE1 complementada, conjugada con plásmido pBBR1MCS-2 con el gen <i>avrXacE1</i> , Ap ^r , Sp ^r , Sm ^r , Km ^r .	Este trabajo
XacΔavrXacE2c	XacΔavrXacE2 complementada, conjugada con plásmido pBBR1MCS-2 con el gen <i>avrXacE2</i> , Ap ^r , Sp ^r , Sm ^r , Km ^r .	Este trabajo
XacΔxac3090c	XacΔXac3090 complementada, conjugada con plásmido pBBR1MCS-2 con el gen <i>Xac3090</i> , Ap ^r , Sp ^r , Sm ^r , Km ^r .	Este trabajo
XacHrpG	Xcc99-1330 conjugada con plásmido pBBR1MCS-3 con el gen <i>hrpG</i> , Ap ^r , Tc ^r .	Este trabajo
XacR210C	Xcc99-1330 conjugada con plásmido pBBR1MCS-3 con el gen <i>hrpG</i> mutante en el aminoácido 210 (Arg por Cys) que codifica para la proteína mutante R210C, Ap ^r , Tc ^r	Este trabajo
XacΔhrpG	mutante <i>hrpG</i> de Xcc99-1330, Ap ^r , Sp ^r .	Este trabajo
XacΔhrpGc-HrpG	XacΔhrpG complementada, conjugada con plásmido pBBR1MCS-3 con el gen <i>hrpG</i> , Ap ^r , Sp ^r , Tc ^r .	Este trabajo
XacΔhrpGc-R210C	XacΔhrpG complementada, conjugada con plásmido pBBR1MCS-3 con el gen <i>hrpG</i> mutante en el aminoácido 210 (Arg por Cys) que codifica para la proteína mutante R210C, Ap ^r , Sp ^r , Tc ^r .	Este trabajo
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101/pMP90	Rif ^r , Gm ^r	Koncz y Schell, 1986

^a cepa bacteriana derivada de *E. coli* K12.

^b cepa bacteriana derivada de *E. coli* B, cepas generales de expresión de proteínas que no poseen la proteasa *lon* y la proteasa de membrana externa *ompT*, que pueden degradar proteínas durante la purificación (Weiner y col., 1994; Grodberg y Dunn, 1988)

3.1.2-Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo que se emplearon para el crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Medios de cultivo.

Nombre	Composición	Referencia
Luria-Bertani (LB)	Peptona 10,0 g/l, Extracto de levadura 5,0 g/l, NaCl 5,0 g/l	Sambrook y col., 1989
Silva Buddenhagen (SB)	Peptona 5,0 g/l, Extracto de levadura 5,0 g/l, Sacarosa 5,0 g/l, Ácido glutámico 1,0 g/l, pH7	Dunger y col., 2007
Medio XVM2	Fructosa 10 mM, Sacarosa 10 mM, casaminoácidos 0,3 g/l, NaCl 20 mM, KH ₂ PO ₄ 0,16 mM, K ₂ HPO ₄ 0,32 mM, MgSO ₄ 5 mM, FeSO ₄ 0,01 mM, CaCl ₂ 1 mM	Wengelnik y Bonas, 1996

Estos medios se utilizaron en cultivos líquidos y sólidos, estos últimos se obtuvieron mediante el agregado de agar a una concentración final de 15 g/l. Según los requerimientos de cada cepa, los medios de cultivo fueron suplementados con los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap), 100 µg/ml para *E. coli* y 25 µg/ml para Xac; gentamicina (Gm), 20 µg/ml para *E. coli* y para Xac; kanamicina (Km), 40 µg/ml para *E. coli* y Xac; estreptomycin (Sm), 100 µg/ml para *E. coli* y 50 µg/ml para Xac; espectinomicina (Sp), 50 µg/ml para *E. coli* y 25 µg/ml para Xac; tetraciclina (Tc) 14 µg/ml para *E. coli* y Xac, cloranfenicol (Cln), 30 µg/ml para cepas de expresión de *E. coli*. Los cultivos se crecieron en medio aeróbico con agitación constante, a 28 °C para las cepas de *Xanthomonas* y a 37 °C para las cepas de *E. coli*. *Agrobacterium tumefaciens* se creció a 28 °C en medio LB con los antibióticos rifampicina (Rf), 100 µg/ml; Gm, 25 µg/ml; Sm/Sp, 100 µg/ml.

3.1.3-Vectores

Los plásmidos o vectores utilizados durante este trabajo de tesis se detallan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Plásmidos utilizados.

Nombre	Descripción	Referencia
pBluescript II KS+	oriR(CoIE1), MSC, <i>lacZ</i> , ori R(f1), Ap ^r . Vector de clonado que permite selección de colonias blancas y azules.	Stratagene
pET28-a	ori(pBR322), MSC, origen f1, promotor T7, <i>lacI</i> , Km ^r . Permite expresar proteínas bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. Las proteínas expresadas en este sistema quedan fusionadas a un péptido de 6 His consecutivas que posibilitan su purificación mediante afinidad a una resina de Ni-NTA.	Novagen, USA
pET32-a	ori(pBR322), MSC, origen f1, promotor T7, <i>lacI</i> , <i>trxA</i> , Ap ^r . Permite expresar la proteína tiorredoxina de <i>E. coli</i> y proteínas de fusión a tiorredoxina bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. Las proteínas expresadas en este sistema también pueden quedar fusionadas a un péptido de 6 His consecutivas que posibilitan su purificación mediante afinidad a una resina de Ni-NTA.	Novagen, USA
pET32-am*	Derivado del vector comercial pET32-a (Novagen, USA) modificado con el fin de realizar fusiones a tiorredoxina (Trx) de <i>E. coli</i> y a un péptido de 6 His consecutivas bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7.	Garavaglia, 2010
pK19mobGII	derivado pUC, oriV, mob, MSC, <i>gusA</i> , <i>lacZα</i> , Km ^r . Vector suicida movilizable que permite la disrupción de genes por integración plasmídica y el intercambio de marcadores por doble evento de recombinación en cepas de <i>Xanthomonas</i> , entre otras bacterias gram negativas.	Katzen y col., 1999
pKRP13	derivado de pUC, Sm ^r , Sp ^r , Ap ^r . Contiene casete de resistencia a Sp/Sm.	Reece y Phillips, 1995
pBBR1MCS-2	rep, mob, MSC, <i>lacZα</i> , Km ^r . Permite realizar clonados en <i>E. coli</i> y puede ser transferido a <i>Xanthomonas</i> por conjugación biparental desde la cepa movilizadora de amplio rango de hospedador <i>E. coli</i> S17-1. Permite expresión constitutiva de genes.	Kovach y col., 1995
pBBR1MCS-3	rep, mob, MSC, <i>lacZα</i> , Tc ^r . Permite realizar clonados en <i>E. coli</i> y puede ser transferido a <i>Xanthomonas</i> por conjugación biparental desde la cepa movilizadora de amplio rango de hospedador <i>E. coli</i> S17-1. Permite expresión constitutiva de genes.	Kovach y col., 1995

pBBR1MCS-5	rep, mob, MSC, <i>lacZ</i> α , Gm ^r . Permite realizar clonados en <i>E. coli</i> y puede ser transferido a <i>Xanthomonas</i> por conjugación biparental desde la cepa movilizadora de amplio rango de hospedador <i>E. coli</i> S17-1. Permite expresión constitutiva de genes.	Kovach y col., 1995
pMP2444(GFP)	vector con secuencia codificante de la proteína autofluorescente EGFP (por enhanced GFP) obtenida a partir del plásmido pEGFP-1 de Clontech, Palo Alto, CA, USA. La secuencia digerida con las enzimas BamHI-XbaI se ligó al vector pBBR1MCS-5 (Gm ^r , Kovach y col., 1995).	Stuurman y col., 2000
pCHF3	origen de replicación para <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> , Sp ^r para selección bacteriana, T-ADN definido con borde derecho y borde izquierdo, <i>nptII</i> (Km ^r) para selección en plantas bajo promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV), MSC con promotor 35S CaMV. Vector binario que permite la transformación de plantas mediada por <i>Agrobacterium</i> .	Jarvis y col., 1998
pPROBE-NT	replicón pBBR1, gen reporter <i>gfp</i> , sitio de múltiple clonado HindIII \rightarrow EcoRI (Km ^r)	Miller y col., 2000

*el vector pET32-a original (Novagen, USA) fue modificado a fin de eliminar la región que codifica el sitio inmunogénico S-tag y el sitio de reconocimiento para la proteasa enteroquinasa, manteniendo el sitio de reconocimiento para la proteasa trombina. Para ello, se amplificó la región de interés por PCR con oligonucleótidos específicos usando como molde el vector comercial. Posterior a la digestión del producto amplificado con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, el fragmento fue nuevamente clonado al vector pET32a digerido con las mismas enzimas. MSC: múltiple sitio de clonado.

3.2-Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos

3.2.1-Técnicas de ADN recombinante

Las técnicas y protocolos básicos de ADN recombinante se realizaron siguiendo los métodos estándares descritos en Sambrook y col. (1989) o de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes y/o proveedores de los insumos y reactivos utilizados. Por ejemplo, las preparaciones de ADN plasmídico, la electroforesis en geles de agarosa, las digestiones de ADN con enzimas de restricción, la recuperación y purificación de ADN a partir de geles de agarosa, las reacciones de ligación de fragmentos de ADN y las transformaciones de células de *E. coli* con ADN plasmídico.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron y optimizaron siguiendo los procedimientos generales descritos por Kidd y Ruano (1995). La amplificación de los fragmentos de ADN de interés se verificó mediante secuenciación. Para reacciones de chequeo, retrotranscripciones (RT) y PCR a partir de ADNc se utilizó la enzima GoTaq polimerasa (Promega) con una temperatura óptima de amplificación de 72 °C. Para amplificar secuencias con alta fidelidad, como en clonados, complementaciones de mutantes y secuencias promotoras se utilizó la enzima Pfx50 (Invitrogen) con una temperatura óptima de amplificación de 68 °C. Se prepararon soluciones stock de dNTPs 10 mM y de oligonucleótidos 10 µM.

3.2.2-Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR durante este trabajo de tesis se detallan a continuación en la tabla 3.4:

Tabla 3.4. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia 5'-3'
XAC0286UK	GTCCGGTACCATCGGAGAGCGACATGGGA
XAC0286D2	CGGTGTCGACATAACCAGAAAGCCTGCCTTG
XAC3224U	ACAGTCCATGGAAATGGGTTGCACTATCTCAAC
XAC3224D	CGGTGTCGACCATCACCGTTACTGGCTCTG
XAC3224UK	ACATGGTACCAATGGGTTGCACTATCTCAAC
XAC3224D2	CGGTGTCGACGCTCTGCTCGCACAGCTG
XAC3090UK	GTCCGGTACCGGGCGCTTACCATTAC
XAC3090D2	CGGTGTCGACAGGTGCCGGGCTTGTTT
XAC3090SL	ACATCCCGGGTGTGTTGTGTGGAATTGTGAGC
HIS	AGTTGAGCTCCTTTGTTAGCAGCCGGATC
HIS2	AGTTGAATTCCAGCAGCCAACCTCAGCT
GFPSU	ACATGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAG
GFPSD	CGGTCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCA
HrpGKpnlup	GACTGGTACCGTGCATGAACGACCACTCTCCC
HrpGXholdown	GCATCTCGAGATCAAACACCCTTCGCTTTAA
HrpGBamHlup	GACTGGATCCATGAACGACCACTCTCCC
5`up EcoRI	GATCGAATTCCCGGTCTCTCTCTTTGGG
5`down SmaI	AGCTCCCGGGGAGTGGTCGTTCAATTTAGG
3`up Sall	GCATGTCGACCGATAACGGAGGCAACGAC
3`down HindIII	TAGCAAGCTTCAGACACCGCTCACTGCC
oligo-Sp	TCTGATAGTTGAGTCGATAC
phrpX up	GCATAAGCTTCAGTGATCTGCCCTCGTGTC
phrpX down	GCATCTGCAGGATCGCTGCAAAGTAAGTGG
phrpG up	GCATAAGCTTTGCCGACCTATTCCAGTCAC
phrpG down	GCATCTGCAGCGTCAACAGGAACACCGATC

16S ARNr up	TGGTAGTCCACGCCCTAAACG
16S ARNr down	CTGGAAAGTTCCGTGGATGTC
hrpX-RT up	CGATGATGAGGTCAGTTTGT
hrpX-RT down	ACTGCGCAAAGCAATTCAAC
hrcC-RT up	TTCGTCTGGTACTACGATGG
hrcC-RT down	CCGAAACGGTATCCACATAC
hrpE-RT-up	ATCAGGATCCATGGAATTATTACCGCAAATCAG
hrpE-RT-down	ATACAAGCTTTTACTGGCCAACGAGCTGCTT
hrpB2-RT-up	ATCAGGATCCAACCAAGCGCTTGTGAATCG
hrpB2-RT-down	ATACAAGCTTCTATTGGTTCTTGACCAGTG

3.2.3-Preparación de ADN genómico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

El ADN genómico se preparó a partir de células de *Xanthomonas* crecidas en 10 ml de medio SB (tabla 3.2) con el agregado del antibiótico correspondiente según cada cepa (tabla 3.1) a 28 °C con agitación constante hasta alcanzar saturación. Se ajustó la densidad óptica del cultivo a 0,3 medida a 600 nm y se centrifugó un volumen de 1,5 ml a 5000 rpm durante 2 min. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril y se centrifugó a 5000 rpm durante 2 min resuspendiéndolo posteriormente en 500 µl de solución de TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con ayuda de una pipeta. A la mezcla anterior se adicionaron 15 µl de SDS 20 % (p/v) y 3 µl de proteinasa K 20 mg/ml (Sigma-Aldrich). Mediante movimientos suaves se mezcló el tubo y se incubó a 37 °C por el término de 1-1,5 hs. Transcurrido el período de incubación, se agregaron 167 µl de NaCl 5 M mezclando suavemente y, posteriormente se adicionaron 80 µl de solución precalentada de CTAB/NaCl (10 g de CTAB y 4,1 g de NaCl en 100 ml de agua), se mezcló y se incubó por 15 min a 65 °C. Se agregaron 700 µl de una mezcla compuesta por cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló durante 10 min y se centrifugó por 5 min a velocidad máxima. Inmediatamente, se removió la fase acuosa que se colocó en un tubo nuevo. Se agregaron 500 µl de una mezcla compuesta por fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló durante 10 min y se centrifugó nuevamente por 5 min a velocidad máxima. En un tubo nuevo, se transfirieron 300-500 µl de la fase acuosa y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol. Seguidamente, se agitó el tubo hasta la observación de un precipitado blanco, se incubó 10 min a -70 °C y se centrifugó durante 25 min a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante, se lavó el ADN con 900 µl de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante (utilizando una micropipeta) y se secó el pellet

obtenido. Finalmente, se resuspendió en 25-100 µl de buffer TE (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA pH 8 1 mM). La solución obtenida se almacenó a 4 °C hasta el momento de su utilización (Ausubel y col., 1987). Se verificó la preparación de ADN en un gel de agarosa al 0,7 % y en caso de ser necesario se incubó el ADN genómico con ARNasa libre de ADNasa a concentración final 150 µg/ml durante 30 min a 37 °C para eliminar el ARN contaminante en la muestra.

3.3-Mutagénesis de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

3.3.1-Conjugación bacteriana

La conjugación bacteriana se utilizó como herramienta para la introducción de plásmidos replicativos o vectores suicidas en *Xanthomonas*. La cepa aceptora de *Xanthomonas* se cultivó en medio SB (tabla 3.2) a 28 °C y los cultivos de la cepa dadora *E. coli* S17-1 transformada con los plásmidos de interés se crecieron en medio LB (tabla 3.2) a 37 °C con los antibióticos correspondientes, en agitación, durante toda la noche hasta alcanzar saturación. Luego, se realizó una dilución 1:10 en medio fresco de la cepa aceptora y se incubó en agitación a 28 °C durante 2-5 hs hasta alcanzar una densidad óptica de 1,0-1,2 a 600 nm. Por otro lado, se realizó una dilución 1:10 del cultivo saturado de la cepa dadora en medio LB fresco y se incubó en agitación durante 1-2 hs hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8-0,9 a 600 nm. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm durante 30 min, se lavaron las bacterias con 10 ml de NaCl 0,9 % (p/v) y se centrifugó nuevamente. Se resuspendieron las células en 1 ml de NaCl 0,9% (p/v). Se colocaron 100 µl de la cepa dadora y aceptora por separado y 100 µl de mezclas 1:1 y 7:3 (aceptora:dadora) en discos de nitrocelulosa estériles de 1 cm de diámetro sobre placas de conjugación conteniendo el medio completo para el crecimiento de la cepa aceptora (SB-agar) en ausencia de antibióticos. Se dejó que las gotas se absorban y luego las placas se incubaron a 28 °C por aproximadamente 48 hs. Pasado este período de tiempo, se removieron los discos de nitrocelulosa de la placa con una pinza estéril y se colocaron en tubos eppendorf conteniendo 1 ml de NaCl 0.9 % (p/v). Mediante el uso de un agitador, se resuspendieron las bacterias en el medio líquido y se plaquearon diluciones adecuadas en medio selectivo con los antibióticos apropiados. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24-72 hs hasta la aparición de colonias bacterianas, que posteriormente fueron aisladas en medio selectivo (Brusin y Rossbach, 1994).

3.3.2-Construcción de cepas mutantes en genes de proteínas efectoras

Las cepas mutantes de *Xanthomonas* en los genes *avrXacE1* (XAC0286, Gene ID en NCBI: 1154357, número de acceso en RefSeq: NP_640642), *avrXacE2* (XAC3224, Gene ID en NCBI: 1157295, número de acceso en RefSeq: NP_643532) y *xac3090* (XAC3090, Gene ID en NCBI: 1157161, número de acceso en RefSeq: NP_643399), que codifican para proteínas efectoras de *Xac*, se construyeron por intercambio de marcador por doble evento de recombinación durante el trabajo de tesis del Dr. Germán Dunger y el detalle de la construcción se encuentra descrito en Dunger (2007) y Dunger y col. (2012).

La cepa *Xac*Δ*avrXacE1/E2*, doble mutante en los genes de las proteínas efectoras *avrXacE1* y *avrXacE2* se construyó por conjugación de la cepa mutante *Xac*Δ*avrXacE1* con la cepa *E.coli* S17-1 transformada con el vector pKmobXAC3224Gm. Este vector se construyó previamente en el laboratorio para generar la mutante simple en el gen *avrXacE2* y se describe con más detalle en Dunger (2007) y Dunger y col. (2012). Luego de la selección de las cepas transconjugantes en medio selectivo mediante resistencia a los antibióticos Gm y Sp/Sm y sensibilidad a Km, se verificó la ausencia de ambos genes efectoras mediante PCR.

3.3.3-Complementación de cepas mutantes en genes de proteínas efectoras

Las cepas mutantes de *Xac* en los genes *avrXacE1*, *avrXacE2* y *xac3090* se complementaron con la secuencia codificante de cada proteína efectora clonada en el vector replicativo pBBR1MCS-2 (tabla 3.3). *avrXacE1* se amplificó a partir de ADN genómico de *Xac* con los oligonucleótidos XAC0286UK y XAC0286D2 (tabla 3.4) y se clonó en el vector pET32-a (tabla 3.3) previamente digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *Sall*, generando la construcción pET0286. El fragmento *avrXacE1-HIS* se amplificó de pET0286 con los oligonucleótidos XAC0286UK y HIS (tabla 3.4) y se clonó en el plásmido pBBR1MCS-5 (tabla 3.3) previamente digerido con las enzimas *KpnI* y *SacI*, generando pBBR0286H. De esta construcción se liberó el fragmento *avrXacE1* con las enzimas *KpnI* y *SacI* y se subclonó en pBBR1MCS-2, generando la construcción pBBR2-0286. *avrXacE2* se amplificó de ADN genómico de *Xac* con los oligonucleótidos XAC3224U y XAC3224D (tabla 3.4) y se clonó en pET32-a previamente digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *Sall*, generando la construcción pET3224. *avrXacE2-HIS* se amplificó de pET3224 con los oligonucleótidos XAC3224UK y HIS (tabla 3.4) y se clonó en pBBR1MCS-5 digerido

previamente con las enzimas *KpnI* y *SacI*, generando la construcción pBBR3224H. De dicha construcción se liberó el fragmento *avrXacE2* con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* y se subclonó en pBBR1MCS-2, generando la construcción pBBR2-3224. *xac3090* se amplificó con los oligonucleótidos XAC3090UK y XAC3090D2 (tabla 3.4) a partir de ADN genómico de *Xac* y se clonó en el vector pET32-a previamente digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *Sall*, generando la construcción pET3090. *xac3090-HIS* se amplificó con los oligonucleótidos XAC3090UK y HIS2 (tabla 3.4) a partir de pET3090 y se clonó en pBBR1MCS-5 previamente digerido con las enzimas *KpnI* y *EcoRI*, generando pBBR3090H. El fragmento *xac3090* se liberó a partir de pBBR3090H por restricción con las enzimas *KpnI* y *EcoRI* y se subclonó en pBBR1MCS-2 generando la construcción pBBR2-3090. Se transformaron células de *E. coli* S17-1 (tabla 3.1) con las construcciones pBBR2-0286, pBBR2-3224 y pBBR2-3090, y se conjugaron con las cepas mutantes *XacΔavrXacE1*, *XacΔavrXacE2* y *XacΔxac3090* (tabla 3.1), respectivamente. Luego de la selección por resistencia al antibiótico Km, las cepas complementadas *XacΔavrXacE1c*, *XacΔavrXacE2c* y *XacΔxac3090c*, se verificaron por PCR.

3.3.4-Construcción de cepas sobreexpresantes del regulador HrpG

Para la construcción de las cepas de *Xac* sobreexpresantes del regulador del sistema de secreción tipo tres HrpG (*XacHrpG*) y del regulador mutante R210C (*XacR210C*), se clonó cada secuencia codificante bajo el control del promotor constitutivo *lacZ* del vector replicativo en *Xanthomonas* pBBR1MCS-3 (tabla 3.3). Del genoma de *Xac* (da Silva y col., 2002) se obtuvo la secuencia codificante para HrpG (XAC1265, Gene ID en NCBI: 1155336, número de acceso en RefSeq: NP_641600) y se diseñaron los oligonucleótidos específicos HrpGKpnIup y HrpGXholdown (tabla 3.4) para amplificar la secuencia. El fragmento obtenido se clonó en el vector replicativo pBBR1MCS-3 previamente digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*. El clonado se verificó por PCR, restricción enzimática y secuenciación de los clones obtenidos luego de la transformación de células de *E. coli* JM109 con la mezcla de ligación. La secuencia codificante mutante del regulador se encontró en los resultados de la secuenciación de los clones obtenidos. Posteriormente se transformó la cepa movilizadora *E. coli* S17-1 con las construcciones pBBR1MCS-3-HrpG y pBBR1MCS-3-R210C y se conjugaron con la cepa salvaje de *Xac* (*Xacwt*, tabla 3.1). Las cepas sobreexpresantes se seleccionaron por resistencia a los antibióticos Ap y Tc.

3.3.5-Construcción de la cepa mutante en el gen *hrpG*

La cepa mutante de *Xanthomonas* en el gen *hrpG* (*Xac*Δ*hrpG*) que codifica para el regulador transcripcional del SSTT se construyó por intercambio de marcador por doble evento de recombinación. Para esto, se amplificaron por PCR las regiones adyacentes al gen *Xac1265*, usando dos pares de oligonucleótidos. A partir de ADN genómico de *Xac* se amplificó la región 5' que se encuentra corriente arriba del gen *hrpG* con los oligonucleótidos 5'up *EcoRI* y 5'down *SmaI* (tabla 3.4) y el fragmento obtenido de 837 pb se clonó en el vector pK19mobGII (tabla 3.3) previamente digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SmaI*, generando la construcción pKmob5'. Luego se amplificó la región 3' que se encuentra corriente abajo del gen con los oligonucleótidos 3'up *Sall* y 3'down *HindIII* (tabla 3.4) y el fragmento obtenido de 1070 pb de longitud se clonó en pKmob5' previamente digerido con las enzimas *Sall* y *HindIII*, generando la construcción pKmob5'3'. El casete de 2 kb que confiere resistencia a los antibióticos Sp y Sm fue digerido con la enzima de restricción *Sall* del vector pKRP13 (tabla 3.3) y se clonó en el mismo sitio de restricción de la construcción pKmob5'3' entre las dos regiones adyacentes del gen *hrpG* previamente clonadas, generando finalmente la construcción pKmob5'Sp3'. Todas las etapas del clonado se realizaron en la cepa *E. coli* JM109. Finalmente, se transformaron células de *E. coli* S17-1 con pKmob5'Sp3' y se conjugó con la cepa salvaje de *Xac*. Luego de la selección por resistencia a Sp/Sm y sensibilidad al antibiótico Km, la cepa mutante se verificó por PCR.

3.3.6-Complementación de la cepa mutante en el gen *hrpG*

La cepa mutante de *Xac* en el gen *hrpG* se complementó con la secuencia codificante del regulador HrpG y con la secuencia codificante del regulador mutante R210C, clonadas previamente en el vector replicativo pBBR1MCS-3 para la construcción de las cepas sobreexpresantes de *Xac* en ambos genes (sección 3.3.4). La cepa *E. coli* S17-1 transformada con las construcciones pBBR1MCS-3-HrpG y pBBR1MCS-3-R210C se utilizó para conjugar la cepa mutante *Xac*Δ*hrpG* obteniendo las cepas complementadas *Xac*Δ*hrpG*c-HrpG y *Xac*Δ*hrpG*c-R210C, respectivamente.

3.4-Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.4.1-Clonado de las secuencias codificantes de las proteínas HrpG y R210C de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en vectores de expresión

Las proteínas HrpG y R210C de Xac se clonaron en vectores de expresión de la serie pET para expresarlas como proteínas de fusión a residuos de HIS en *E. coli* y así purificarlas por cromatografía de afinidad a resinas de Ni-NTA. A partir de los plásmidos pBBR1MCS-3-HrpG y pBBR1MCS-3-R210C descritos anteriormente (sección 3.3.4) se amplificaron por PCR las secuencias codificantes con los oligonucleótidos HrpGBamHIup y HrpGXholdown (tabla 3.4). Los productos obtenidos se clonaron en los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI* de los vectores pET28-a y pET32-am (tabla 3.3), obteniendo las construcciones pET28-a-HrpG y pET28-a-R210C, o pET32-am-HrpG y pET32-am-R210C, respectivamente. Luego de verificar los clonados, se transformaron en las cepas de expresión *E. coli* BL21 (DE3) pLys S⁺ o BLR (tabla 3.1), para expresar y purificar las proteínas recombinantes. Todas las etapas de clonado se realizaron en la cepa *E. coli* DH5 α (tabla 3.1). Los clones positivos obtenidos se corroboraron mediante PCR en colonia, minipreparaciones de ADN plasmídico, linealización de los plásmidos, liberación de insertos y secuenciación.

3.4.2-Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en cepas de *E. coli*

La inducción de la expresión de proteínas recombinantes en las diferentes cepas de *E. coli*, se realizó con el inductor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) según los protocolos generales descritos por Sambrook y col. (1989). En cada caso particular se realizaron las modificaciones necesarias que se detallan en el texto. En general, se cultivaron las bacterias en medio líquido LB con los antibióticos correspondientes a 37 °C con agitación constante hasta saturación del medio de cultivo. Luego, el cultivo se diluyó 1:100 en medio LB fresco y se incubó en idénticas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,7-1,0 a 600 nm. En ese momento, se indujo la expresión de proteínas mediante el agregado de IPTG, variando su concentración final entre 0,1 y 0,5 mM, continuando la incubación por un período adicional de 4 a 18 hs, entre 18 °C y 37 °C, según cada ensayo hasta obtener las condiciones óptimas para cada proteína recombinante (las condiciones óptimas están detalladas en el capítulo III). Posteriormente, las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm, a 4 °C

durante 15 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió inmediatamente para proceder a la preparación de los extractos proteicos o se congeló a -20 °C hasta su procesamiento.

3.4.3-Obtención de los extractos proteicos

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) pLys S` o BLR (tabla 3.1) provenientes de cultivos inducidos se resuspendieron en 1 ml de solución de lisis celular conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) 1 mM, MgCl₂ 5 mM y ADNasa 10 µg por cada 10 ml de cultivo inducido. Después de la ruptura celular mediante sonicación, los lisados se clarificaron por centrifugación a 12000 rpm, a 4 °C durante 30 min. Luego de la centrifugación, los sobrenadantes se recuperaron para su procesamiento.

3.4.4-Purificación de las proteínas recombinantes

Las condiciones de purificación se optimizaron para cada proteína en particular con el objetivo de obtener el mayor rendimiento y grado de pureza para los experimentos específicos y se detallan en el texto. A continuación se describe un protocolo general utilizado en las purificaciones por cromatografía de afinidad de las proteínas HrpG, R210C y Tiorredoxina (Trx), todas clonadas en vectores de la serie pET (pET28-a o pET32-am) y fusionadas a colas de 6 aminoácidos de histidina (HIS). Para la purificación se utilizó una resina de Ni²⁺-agarosa (Ni-NTA, QIAgen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los pasos de purificación se realizaron con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM. La elución de las proteínas unidas por afinidad a la matriz se realizó con imidazol 100-150 mM en la misma solución, previo lavado de la resina con imidazol 10 mM. Las purificaciones se realizaron siempre a 4 °C, se tomaron alícuotas de cada paso de la purificación para evaluar los resultados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y las muestras se guardaron a 4 °C o -70 °C para su posterior utilización. En el caso de HrpG, R210C y Trx se dializaron los eluidos con Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, a 4 °C en agitación durante toda la noche con dos cambios de volumen y una membrana de diálisis adecuada.

3.5-Métodos analíticos

3.5.1-Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas purificadas se realizó por método colorimétrico y medida de absorbancia (Sedmak y Grossberg, 1977). Para cada muestra se tomaron distintos volúmenes, se agregó agua destilada hasta completar 500 μ l y se adicionaron 500 μ l del colorante (coomassie Brilliant Blue G250 0,06 % en 3 % ácido perclórico (concentración final 0,3 M) o en 2,2 % HCl (concentración final 0,6 M)). Se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) y un blanco con agua destilada. Se midió la absorbancia de todos los tubos a 595 nm en un espectrofotómetro Ultraspec 1100-pro (Amersham Biosciences). Luego se graficó la curva de calibración con la planilla de cálculo Microsoft Office Excel y a partir de la ecuación de la recta se calculó la concentración de proteínas en las muestras incógnitas.

3.5.2-Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Los patrones de proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). La concentración final de acrilamida en los geles de separación se ajustó entre 12 y 15 % según el tamaño de las proteínas a separar. Antes de la siembra, las muestras proteicas se desnaturalizaron a 100 $^{\circ}$ C durante 10 min en una solución de siembra con azul de bromofenol 0,005 % (p/v), glicerol 5 % (v/v), SDS 2 % (p/v) y β -mercaptoetanol 1 % (v/v). Las electroforesis se llevaron a cabo en equipos Miniprotean III (Bio-Rad) a una intensidad de corriente constante de 20 mA por gel y en solución de corrida conteniendo Tris-HCl pH 8 25 mM, glicina 1,44 % (p/v) y SDS 0.05 % (p/v).

Como marcadores de peso molecular se utilizaron: albúmina sérica bovina (BSA) (66 kDa), glutatión-S-transferasa (GST) (26 kDa), Tiorredoxina (Trx) (12 kDa) y ribonucleasa A (ARNasa A) (13,7 kDa).

Luego de la corrida electroforética, las proteínas se visualizaron mediante fijación del gel con ácido acético 10 % (v/v), tinción con azul brillante de coomassie R250 disuelto en metanol:ácido acético glacial:agua destilada (5:1:4) y decoloración, de acuerdo al protocolo descrito en Sambrook y col. (1989).

3.5.3-Western-blot: electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa

La detección de proteínas por western-blot se realizó mediante SDS-PAGE seguido de electrotransferencia de las mismas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amershan Pharmacia) en una cuba de transferencia (Trans-blot, Bio-Rad) durante una noche, con agitación permanente, a 4 °C y a una intensidad de corriente constante de 40 mA, en una solución de Tris-HCl 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,03 % (p/v) y metanol 20 % (v/v) a pH 8.

3.5.4-Western-blot: inmunodetección y revelado por colorimetría

Las proteínas inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa se detectaron con anticuerpos específicos. Para ello, primero se bloqueó la membrana de nitrocelulosa durante 1 h con una solución 5 % (p/v) de leche descremada en polvo de origen comercial preparada en PBS (NaCl 13,7 mM; KCl 0,27 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 0,43 mM y KH₂PO₄ 0,14 mM, a pH 7,3) para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo. Posteriormente se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo primario diluido en 10 ml de la misma solución de bloqueo. Transcurrido este tiempo, se realizaron cuatro lavados de 15 min cada uno en la misma solución. Posteriormente, se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina diluido en 10 ml de la solución de trabajo y a continuación se realizaron cuatro lavados más de 15 min en la misma solución. Pasado este tiempo, la membrana se lavó dos veces durante 5 min con una solución de Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM y seguidamente se sumergió en 15 ml de la misma solución a la que se agregó NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) 0,03 % (p/v) y BCIP (sal *p*-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) 0,016 % (p/v). La membrana se incubó en oscuridad a 37 °C hasta obtener desarrollo del precipitado coloreado de formazán sobre la misma (Towbin y col., 1979). Todos los lavados y las incubaciones se realizaron con agitación suave y permanente. En este trabajo de tesis se utilizaron los siguientes anticuerpos: IgG de conejo anti-H1Stag (Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad), IgG de conejo anti-flagelina (Castelli y col., 2008).

3.6-Expresión y localización *in planta* de las proteínas efectoras de Xac

3.6.1-Construcción de los vectores de expresión de las proteínas efectoras de Xac fusionadas a la proteína fluorescente verde GFP

La secuencia codificante de la proteína fluorescente verde (GFP) se amplificó a partir del vector pMP2444 (tabla 3.3) con los oligonucleótidos GFPSU y GFPSD (tabla 3.4), y se clonó en los vectores pBBR0286H, pBBR3224H y pBBR3090H, descritos en la sección 3.3.3, previamente digeridos con las enzimas de restricción *XhoI* y *Sall*, generando las construcciones pBBR0286GFP, pBBR3224GFP y pBBR3090GFP, respectivamente. Luego, se amplificó *avrXacE1-GFP* a partir de pBBR0286GFP con los oligonucleótidos XAC0286UK y GFPSD (tabla 3.4), se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* y se clonó en los mismos sitios de restricción del vector binario pCHF3 (tabla 3.3), generando así la construcción pCHF30286. *avrXacE2-GFP* se amplificó de pBBR3224GFP con los oligonucleótidos Xac3224UK y GFPSD (tabla 3.4), se digirió con las enzimas *KpnI* y *XhoI* y se clonó en pCHF3 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, generando la construcción pCHF33224. *xac3090-GFP* se amplificó a partir de pBBR3090GFP con los oligonucleótidos XAC3090SL y GFPSD (tabla 3.4), se digirió con las enzimas de restricción *SmaI* y *XhoI* y se clonó en pCHF3 previamente digerido con las mismas enzimas, generando la construcción pCHF33090.

3.6.2-Agroinfiltración

Los vectores pCHF30286, pCHF33224 y pCHF33090, que contienen los genes codificantes de las proteínas efectoras de Xac *AvrXacE1*, *AvrXacE2* y *Xac3090*, respectivamente, fusionadas en marco al extremo *N*-terminal de la proteína fluorescente GFP; se electroporaron en células de *A. tumefaciens* GV3101 (tabla 3.1) con un equipo Gene Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para las infiltraciones, las células de *A. tumefaciens* transformadas se crecieron en medio líquido LB (tabla 3.2) a 28 °C en agitación durante 18 hs. Luego se diluyeron los cultivos 1:2000 en medio LB fresco con el agregado de acetosiringona a concentración final 20 µM y se incubaron nuevamente a 28 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 1,0 a 600 nm. Los cultivos resultantes se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en solución estéril de MgCl₂ 10 mM, ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES) 10 mM y acetosiringona 100 µM a una densidad óptica a 600 nm de 0,5 y se

incubaron durante 3 hs a 25 °C. Estos cultivos se usaron para infiltrar hojas de 4 o 5 semanas de *N. benthamiana* y naranja, usando jeringas estériles sin agujas.

3.6.3-Localización *in planta* de las proteínas de fusión a GFP

Para determinar la localización *in planta* de las proteínas efectoras se observó la fluorescencia de las proteínas de fusión a GFP y de los núcleos de las células vegetales teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33258, a distintos tiempos post-infiltración. Para esto, se cortaron secciones de tejido vegetal y se fijaron en metanol 100 % (v/v) frío durante 1 min, se lavaron en PBS (NaCl 13,7 mM; KCl 0,27 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 0,43 mM y KH₂PO₄ 0,14 mM, a pH 7,3) durante 1 min y luego se tiñeron durante 4 min con el reactivo Hoechst 33258 1 µg/ml. Las secciones de tejido se lavaron durante 2 min en PBS y se montaron en portaobjetos con glicerol 50 % (v/v) para su observación en un microscopio de barrido láser confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). GFP se excitó con un láser argón 40 mW a 488 nm y se usó un filtro de emisión de 497 a 526 nm de longitud de onda. Hoechst 33258 se excitó con un diodo azul 17 mW a 408 nm y se usó un filtro de emisión de 405 a 565 nm de longitud de onda.

3.7-Cultivos de plantas

Para las inoculaciones con las cepas de *Xanthomonas* se utilizó como modelo de planta hospedadora: plantas de naranja (*Citrus sinensis* cv. *valencia*), y como no hospedadoras: plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. *platense*) y algodón (*Gossypium hirsutum* cv. DP 404Bg). Para las agroinfiltraciones y la expresión transiente de las proteínas efectoras de Xac fusionadas a GFP se utilizaron también plantas de *Nicotiana benthamiana*. Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 hs de luz (150 µE m⁻² s⁻¹) y 8 hs de oscuridad. La temperatura osciló entre 25 y 20 °C durante los ciclos de luz/oscuridad, respectivamente. La humedad se mantuvo aproximadamente en 80 %.

3.8-Inoculación de hojas por el método de presión

Para la inoculación de hojas de plantas hospedadoras y no hospedadoras, las cepas de Xac se crecieron en agitación a 28 °C en 10 ml de medio líquido SB (tabla 3.2)

suplementado con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar saturación del cultivo. Luego, se realizó una dilución 1:100 en MgCl₂ 10 mM (equivalente a aproximadamente 10⁷ UFC/ml) y se inoculó sobre la superficie abaxial e inmediaciones de las venas laterales de las hojas de las plantas a tratar, previamente esterilizadas con hipoclorito de sodio 2 % (v/v) o etanol 75 % (v/v). Mediante la utilización de una jeringa desechable de 3 ml de volumen sin aguja y la aplicación de presión al émbolo de la jeringa se logró el ingreso de las bacterias al tejido vegetal. Finalmente, las plantas infiltradas se mantuvieron en la cámara de cultivo con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 hs, respectivamente; a una temperatura de 25/20 °C.

3.9-Curva de crecimiento bacteriano *in planta*

La determinación del crecimiento bacteriano *in planta* se realizó mediante el recuento de bacterias provenientes de hojas infectadas. Para ello, se cortó con un sacabocados un disco de 0,8 cm de diámetro de tejido infectado a distintos tiempos post inoculación. Los discos se sumergieron en 100 µl de MgCl₂ 10 mM donde se disgregaron mecánicamente. Se realizó una decantación forzada de los restos de hojas mediante centrifugado a 6000 rpm durante 15 s. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en solución estéril de MgCl₂ 10 mM que se plaquearon con espátula de Drigalsky sobre placas de Petri con medio SB-agar suplementado con los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron en estufa a 28 °C por 48 hs y luego se realizó el conteo manual de las colonias aisladas crecidas en cada placa. Los resultados se expresaron como UFC/cm² de tejido infectado. Las curvas de crecimiento *in planta* se repitieron al menos por triplicado y se analizaron mediante el uso de ANOVA.

3.10-Cuantificación de áreas de necrosis en los tejidos vegetales infectados

Los porcentajes de las áreas necróticas en las lesiones se calcularon como área de necrosis por zona infectada. Las áreas se midieron a partir de imágenes digitalizadas de treinta hojas infectadas luego de 8 días post inoculación, usando el software Adobe Photoshop y se analizaron mediante el uso de ANOVA.

3.11-Determinación de parámetros fotosintéticos y pigmentos

3.11.1-Medidas de extinción de la fluorescencia de clorofilas

Los parámetros de fluorescencia de clorofila (Chl a) se determinaron con un fluorómetro de amplitud modulada (Qubit System Inc., Kingston, Ontario) conectado a una computadora portátil usando un programa específico para la adquisición de datos (Logger Pro3 Version). Las hojas de naranja, infiltradas con diluciones de cultivos bacterianos de *Xac* o *A. tumefaciens*, se ubicaron entre el haz de luz que excita a las moléculas de clorofila y el fotodiodo que mide fluorescencia. La fluorescencia mínima (F_0) de la hoja adaptada a oscuridad se midió luego de aclimatar las hojas en oscuridad por un período aproximado de 120 min, solamente con el diodo emisor de luz (LED, light-emitting diode) encendido. La intensidad de la luz LED es insuficiente para promover la fotosíntesis y no genera alteraciones en el estado de adaptación a oscuridad. El nivel máximo de fluorescencia (F_m) de la hoja adaptada a oscuridad, la emisión de fluorescencia de la hoja adaptada a luz actínica (F') y el nivel máximo de fluorescencia durante la adaptación a luz (F'_m) se midieron al exponer las hojas a un pulso corto de 0,8 s de luz blanca saturante ($5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las hojas infectadas con cepas bacterianas se iluminaron con luz actínica de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta alcanzar un nivel estable de fluorescencia. Los parámetros fotosintéticos calculados en este trabajo se detallan sintéticamente a continuación en la tabla 3.5 (Baker y Rosenqvist, 2004).

Tabla 3.5. Parámetros fotosintéticos (Adaptado de Baker y Rosenqvist, 2004).

Parámetro	Definición	Significado fisiológico
F_v/F_m	Eficiencia cuántica potencial del FSII $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$	Eficiencia máxima en la cual la luz absorbida por el complejo antena del FSII se convierte en energía química (reducción de Q_A). Disminuciones en este valor se asocian con daño foto-oxidativo del FSII.
F'_v/F'_m	Eficiencia cuántica efectiva del FSII $F'_v/F'_m = (F'_m - F'_0)/F'_m$	Indica una estimación de la eficiencia máxima fotoquímica del FSII a una dada intensidad de luz, corresponde a la eficiencia operativa del FSII si todos los centros del FSII estuviesen abiertos (Q_A oxidada).

F'_q/F'_m	Eficiencia operativa del FSII $\phi_{FSII}=(F'_m- F')/F'_m$	Estima la eficiencia a la cual la luz absorbida por el complejo antena del FSII es usada para fotoquímica (reducción de Q_A). A una dada intensidad de luz provee una medida de la eficiencia cuántica del transporte lineal de electrones a través del FSII. Este factor está directamente relacionado con la tasa de asimilación de CO_2 en la hoja.
-------------	--	---

3.11.2-Determinación de pigmentos vegetales

La extracción de clorofila se realizó como se describe en Lichtenthaler (1987). Brevemente, se inocularon hojas de naranja con la cepa salvaje y las cepas mutantes en los genes efectores de Xac y luego de 4 días se cortaron discos de 1 cm² de área y se colocaron en tubos con 1 ml de etanol 100 % (v/v), se cerraron y se incubaron en oscuridad a 60 °C durante 48 hs. Se midió la absorbancia del extracto clarificado a 649, 665 y 750 nm de longitud de onda y las concentraciones de clorofila a, b, a + b y carotenoides se calcularon por cm² de área infectada, por peso fresco de tejido. Los experimentos se repitieron por triplicado y los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA.

3.12-Ensayos microbiológicos en medios de cultivo sólidos

3.12.1-Determinación de la secreción de proteasas

Para los ensayos de secreción de proteasas se prepararon placas de SB agar o XVM2 agar suplementados con una solución 0,5 % de leche descremada (concentración final) en PBS (NaCl 13,7 mM; KCl 0,27 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 0,43 mM y KH₂PO₄ 0,14 mM, a pH 7,3), con el agregado de los antibióticos correspondientes. La secreción de proteasas se determinó por la visualización de un halo claro de degradación de proteínas de la leche alrededor de la colonia bacteriana, en caso de ser necesario se incubó la placa con una solución de HCl 1 % para visualizar mejor los halos claros de degradación proteica. El halo se midió desde el borde de la colonia hasta el borde del halo y también por diferencia del diámetro total del halo menos el diámetro total de la colonia, obteniendo el mismo resultado por ambas técnicas.

3.12.2-Determinación de la secreción de amilasas

Los ensayos de secreción de amilasas se realizaron en placas de SB agar o XVM2 agar suplementados con 0,2 % de almidón soluble, más los antibióticos correspondientes. La degradación de almidón por la secreción de α -amilasas bacterianas se determinó tiñendo la placa con una solución de lugol (Britania) y observando los halos claros de degradación alrededor de la colonia en contraste con el color marrón de la placa teñida. Los halos se midieron de igual manera que en el caso de la secreción de proteasas.

3.12.3-Determinación de la secreción de celulasas

Para los ensayos de secreción de celulasas se prepararon placas de SB agar o XVM2 agar suplementados con 0,1 % de carboximetilcelulosa y se revelaron tiñendo las placas con solución 0,1 % de rojo congo en agua destilada durante 20 min. Luego se lavaron con NaCl 1 M y se observó la degradación de celulosa por la presencia de halos claros alrededor de las colonias en contraste con el color rojo de la placa. La medida de los halos se determinó como se describió previamente.

Los protocolos para los ensayos de secreción de proteasas, amilasas y celulasas son adaptaciones de los protocolos descritos en Thowthampitak y col. (2008). En todos los casos las placas con los medios específicos se inocularon con 20 μ l de cultivos bacterianos crecidos durante 5 hs a 28 °C en agitación (o en fase exponencial de crecimiento) en medio líquido SB o XVM2, provenientes de una dilución 1:10 de cultivos saturados. Luego de 24-48 hs se visualizaron las placas y se midieron los halos de actividad proteasa, amilasa o celulasa, según cada ensayo. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y cada uno se realizó por duplicado. Todos los datos fueron analizados posteriormente mediante ANOVA.

3.13-Ensayos de movilidad bacteriana

A partir de cultivos líquidos en SB crecidos durante 16 hs a 28 °C se realizaron diluciones 1:10 en SB líquido y se incubaron a 28 °C en agitación durante 5 hs. Con estas células en fase exponencial de crecimiento, se inocularon 5 μ l en placas de swimming (SB 0,3 % agar) y de swarming (SB 0,7 % agar), y las placas se incubaron en cámara húmeda a 28 °C durante 48 hs. Transcurrido ese tiempo se determinó el diámetro de las colonias

(Gottig y col., 2009). Se realizaron tres experimentos independientes y cada uno se realizó por duplicado; los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA.

3.14-Análisis de proteínas flagelares

La determinación de los niveles de las proteínas flagelares bacterianas se realizó mediante western-blot usando anticuerpos policlonales anti-flagelina como se describe en Gottig y col. (2009), con algunas modificaciones. Brevemente, cultivos bacterianos saturados de las distintas cepas de Xac analizadas, se centrifugaron y se resuspendieron las células en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Tritón X-100 0,1 %, MgCl₂ 5 mM y ADNasa 10 µg por cada 10 ml de cultivo inducido. Alícuotas con iguales cantidades de proteínas totales se hirvieron con buffer de siembra para geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se llevó a cabo la electroforesis en un SDS-PAGE al 12 %. Posteriormente se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa y se realizó el western-blot siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.5.4 con un anticuerpo primario anti-flagelina (Castelli y col., 2008).

3.15-Análisis transcripcional

3.15.1-Obtención de ARN bacteriano con TRIzol®

A partir de cultivos bacterianos crecidos en medio líquido SB y XVM2 se centrifugaron 1 y 10 ml del cultivo respectivamente y las células se resuspendieron en 1 ml del reactivo TRIzol® (Invitrogen) y el ARN total fue aislado siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de la preparación del ARN bacteriano, se realizó un tratamiento con ADNasa I libre de ARNasas (Promega) para su posterior utilización como molde en la reacción de retrotranscripción donde se utilizó 1 µg de ARN total.

3.15.2-Obtención de ARN bacteriano a partir de hojas infectadas

Las preparaciones de ARN bacteriano presente en plantas inoculadas se realizaron a distintos tiempos post inoculación, según el protocolo descrito en Mehta y Rosato (2003). Se inocularon hojas de naranja con las cepas de Xanthomonas en estudio (sección 3.8) y a distintos tiempos post inoculación se decontaminaron con alcohol 70 % (v/v), se cortaron y separaron las nervaduras con bisturí estéril y se incubaron durante 1 h en una

placa de vidrio estéril con 20 ml de MgCl₂ 10 mM a fin de permitir que la bacteria exude desde el tejido vegetal al líquido. En caso de ser necesario se maceró el tejido mecánicamente con mortero y pilón sin disgregarlo completamente. La suspensión bacteriana obtenida fue separada de las hojas succionando con pipeta el líquido y centrifugando para recuperar las células bacterianas que posteriormente fueron lavadas con MgCl₂ 10 mM. Luego de una centrifugación a baja velocidad se resuspendieron las células en 500 µl del reactivo TRIzol® (Invitrogen) para la extracción de ARN total siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

3.15.3-Reacción de retrotranscripción

Las moléculas de ADNc se sintetizaron a partir de 1 µg de ARN total usando la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) y el oligonucleótido dN6. Las condiciones de reacción fueron: 2 min a 72 °C, 1 h a 42 °C y 5 min a 94 °C.

3.15.4-Reacción de amplificación por PCR

Luego de la transcripción reversa las muestras de ADNc se utilizaron como molde en reacciones de PCR en un volumen final de 25 µl con oligonucleótidos específicos para amplificar los genes de interés (tabla 3.4). Como control, se amplificó un fragmento del ARNr 16S con los oligonucleótidos 16S ARNr up y 16S ARNr down (tabla 3.4). Las condiciones de amplificación para todos los casos fueron: 1 min a 94°C, seguido por 25 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C y 1 min a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C, utilizando la enzima GoTaq (Promega).

3.16-Ensayos de activación transcripcional mediante el gen reportero *gfp*

3.16.1-Clonado de las secuencias promotoras en el vector reportero

La regiones promotoras de los genes *hrpG* y *hrpX*, denominadas P_{hrpG} y P_{hrpX} respectivamente, se clonaron en el sitio de múltiple clonado del vector reportero pPROBE-NT (tabla 3.3), corriente arriba de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente GFP. Para esto se amplificaron por PCR las secuencias correspondientes con los oligonucleótidos específicos phrpG up y phrpG down, y phrpX up y phrpX down (tabla 3.4). Los productos obtenidos se clonaron en los sitios de restricción *HindIII* y *PstI* del vector pPROBE-NT, obteniendo las construcciones pPROBE-NT-P_G y pPROBE-NT-P_X. Las

mezclas de ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α (tabla 3.1) y luego se aislaron clones resistentes al antibiótico Km que se verificaron mediante minipreparación y secuenciación de las construcciones.

3.16.2-Determinación de la activación transcripcional mediante fluorescencia

La activación transcripcional mediada por los promotores P_{hrpG} y P_{hrpX} se determinó mediante la fluorescencia de la proteína GFP. Para esto los vectores construidos pPROBE-NT-P_G, pPROBE-NT-P_X y el vector vacío pPROBE-NT, se conjugaron en la cepa salvaje de Xac y en la cepa mutante Xac Δ hrpG. Una vez obtenidas las cepas de Xac con los plásmidos reporteros se crecieron cultivos en medio líquido SB y XVM2 (tabla 3.2) durante 18 hs a 28°C; luego se centrifugaron, se lavaron y resuspendieron las células en igual volumen de MgCl₂ 10 mM. La fluorescencia de GFP se determinó en un lector de microplacas multi-mod o (Synergy 2, BioTek Instrumentes, Inc.), con una longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 528 nm. La intensidad de fluorescencia se expresó en unidades arbitrarias y se normalizó a la densidad óptica de cada cultivo determinada a 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas (PowerWave HT, BioTek Instrumentes, Inc.). Las veces de inducción de una construcción promotor-reportero en una cepa se determinaron en relación a la misma cepa conjugada con el vector vacío que se consideró como control de no inducción.

3.17-Ensayos de retardo en gel de la movilidad electroforética

3.17.1-Clonado de las secuencias promotoras de los genes *hrpG* y *hrpX*

Las regiones promotoras de los genes *hrpG* y *hrpX* de Xac, denominadas P_{hrpG} y P_{hrpX}, respectivamente, se amplificaron mediante PCR con los pares de oligonucleótidos phrpG up y phrpG down, phrpX up y phrpX down (tabla 3.4), respectivamente. Los fragmentos obtenidos de 460 pb en el caso de P_{hrpG} y 444 pb para P_{hrpX}, se clonaron en los sitios de restricción *Hind*III y *Pst*I del vector pBluescript II KS+ (tabla 3.3). Los clones positivos obtenidos se verificaron por PCR, digestión enzimática y secuenciación; y se utilizaron luego como molde en las reacciones de PCR para generar las sondas marcadas radiactivamente que se utilizaron en los ensayos de interacción ADN-proteína.

3.17.2-Reacción de marcación y fosforilación de oligonucleótidos con [γ - 32 P]ATP

Los oligonucleótidos reversos phrpX down y phrpG down (tabla 3.4) se marcaron con fósforo radiactivo mediante una reacción de fosforilación en un volumen final de 20 μ l conteniendo 30 μ Ci de [γ - 32 P]ATP (Stock: 10 mCi/ml, 3000 Ci, 111TBq/mmol), 1X buffer A (Forward reaction) de la enzima T4 polinucleótido quinasa (T4PNK, Fermentas), 20 u de T4PNK (Stock: 10u/ μ l, Fermentas), 10 pmoles de oligonucleótido reverso (phrpG down o phrpX down) y agua filtrada estéril. Se Incubó la mezcla durante 1 h y 30 min a 37°C en termobloque y luego se desaló para remover el exceso de [γ - 32 P]ATP con las columnas comerciales Zeba™ Spin (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Luego del desalado se cuantificó 1 μ l del oligonucleótido marcado radiactivamente en contador de centelleo para determinar el rendimiento de la reacción de marcación.

3.17.3-Obtención de la sonda promotora marcada radiactivamente

Antes de marcar radiactivamente las sondas promotoras P_{hrpG} y P_{hrpX}, se optimizaron las condiciones de reacción de PCR y el programa adecuado para cada fragmento a amplificar. Para ambas secuencias promotoras analizadas se preparó la siguiente reacción de PCR en un volumen final de 50 μ l: 1X buffer Pfx50 polimerasa (Invitrogen), 0,25 mM dNTPs (Promega), 10 pmoles de oligonucleótido reverso marcado radiactivamente (phrpG down o phrpX down, ver sección 3.17.2), 10 pmoles de oligonucleótido directo (phrpG up o phrpX up, tabla 3.4), 2,5 u de Pfx50 polimerasa (Invitrogen) y 2 μ l de una dilución 1:20 de minipreparación de ADN plasmídico de las construcciones en el vector pBluescript II KS+ (sección 3.17.1) usadas como molde de la reacción de PCR. El programa de amplificación utilizado para ambas secuencias promotoras fue de 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 40 s a 50 °C, 50 s a 68 °C y un paso final de extensión de 10 min a 68 °C. Luego de la reacción de PCR se sembró el producto obtenido en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y después de la corrida electroforética se visualizó el gel teñido con bromuro de etidio en un transiluminador UV. Se cortó una porción del gel con las bandas de interés con una hoja de bisturí estéril y se purificó la sonda marcada radiactivamente a partir del fragmento del gel con el kit de purificación de ADN "Illustra GFX" (GE Healthcare) según las indicaciones del fabricante. La sonda se eluyó en un volumen final de 25-30 μ l y se cuantificó 1 μ l en contador de centelleo para determinar el rendimiento

de la marcación de la sonda en cpm/ μ l. Las sondas también se cuantificaron espectrofotométricamente mediante absorción a 260 nm a fin de determinar su concentración en μ g/ μ l. Las sondas no marcadas radiactivamente, también denominadas sondas frías, que se utilizaron en los ensayos de competición específica; se prepararon mediante PCR con las mismas condiciones del medio de reacción e igual programa de amplificación, pero los oligonucleótidos utilizados no se marcaron previamente con fósforo radiactivo.

3.17.4-Reacción de unión ADN-proteína, electroforesis en gel de poliacrilamida y revelado.

Las reacciones de unión entre las sondas de ADN con la región promotora correspondiente (P_{hrpX} o P_{hrpG}) y las proteínas HrpG o R210C purificadas, se realizaron en un volumen final de 20 μ l conteniendo Tris-HCl 5 mM pH 7, glicerol 5 % (v/v), KCl 25 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, 1 ng (1000 cpm/ μ l) del ADN correspondiente marcado radiactivamente y la proteína purificada. Dependiendo del ensayo se realizaron diferentes agregados de proteína (HrpG o R210C), competidor específico o sonda fría no marcada radiactivamente (P_{hrpX} o P_{hrpG}), competidor inespecífico (ADN de espermatozoos de salmón o poli dI-dC), tiorredoxina y otros reactivos que se ensayaron para determinar las condiciones óptimas de interacción que se detallan junto con las concentraciones utilizadas en el capítulo III de Resultados y Discusión. Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y luego se sembraron en un gel de poliacrilamida nativo al 5 % (p/v) previamente pre-corrido a 4 °C a 200 V hasta alcanzar una corriente constante. El gel de poliacrilamida se preparó de la siguiente manera: acrilamida:bisacrilamida (30:1) 5 %; TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico, 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3); glicerol 5 % (v/v); TEMED 0,075 % (v/v) y APS 0,16 % (p/v). Como solución de corrida electroforética se usó el buffer TBE. La corrida electroforética de las muestras se realizó a 4 °C a 150 V durante aproximadamente 1-2 hs. Los geles se secaron a 80 °C durante 45 min en un secador de geles (Gel Dryer 583, Bio-Rad) con bomba de vacío y se los expuso en pantallas (Storage Phosphor Screens, Amersham Biosciences) que se revelaron en un escáner STORM 840 (GE-Amersham-Biosciences). Una modificación de este protocolo que se utilizó durante la optimización de los ensayos de retardo consistió en geles de poliacrilamida nativos al 4 % (p/v) preparados de la siguiente manera:

acrilamida:bisacrilamida (80:1) 4 %; TGE (Tris-HCl 25 mM pH 8,5; glicina 190 mM; EDTA 1,05 mM); glicerol 2,5 % (v/v), TEMED 0,085 % (v/v) y APS 0,225 % (p/v). Como buffer de corrida se utilizó en este caso TGE, la pre-corrida y la corrida se hicieron durante el mismo tiempo y a igual voltaje.

3.17.5-Determinación de las constantes de equilibrio Kd

Las gráficas del porcentaje de sonda marcada unida a la proteína en estudio en función de la concentración de proteína agregada a la mezcla de reacción, y las constantes de equilibrio de disociación Kd se determinaron como se describe en Fuhrmann y col. (2009) y Schöning y col. (2007). Brevemente, se incubaron cantidades crecientes de proteína con la sonda marcada radiactivamente. Se determinó la cantidad de sonda unida y sonda libre, y el log de la relación sonda unida/sonda libre se graficó en función del log de la concentración de proteína. Del ajuste y la intercepción con el eje x se obtuvo el log de la Kd. Los resultados son producto de al menos tres experimentos independientes.

3.18-Métodos bioinformáticos

La búsqueda de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas de interés se realizaron en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los análisis de homología de secuencias y los alineamientos se realizaron mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, Altschul y col., 1990; Altschul y col., 1997; Altschul y col., 2005) y la herramienta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, Larkin y col., 2007; Goujon y col., 2010) del EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/>).

La determinación de parámetros físicos y químicos de proteínas se realizó con la herramienta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>, Gasteiger y col., 2005), disponible a través del servidor ExPASy (<http://expasy.org/>).

La identificación de dominios conservados en las secuencias de proteínas se realizaron mediante la base de datos Conserved Domains Database (CDD,) y Conserved Domains Search tools (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) de NCBI (Marchler-Bauer y col., 2011; Marchler-Bauer y col., 2009; Marchler-Bauer y Bryant, 2004).

Para el análisis de las regiones promotoras bacterianas y la identificación de secuencias regulatorias se utilizaron las siguientes herramientas disponibles en la página web “Promoters and Terminators” (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>):

- Promoter Prediction by Neural Network (Martin Reese, Lawrence Berkeley Laboratory, CA, U.S.A.), http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html (Reese, 2000; Reese, 2001).

- BPROM (Prediction of Bacterial Promoters) (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), herramienta disponible en el servidor Softberry Inc. (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>).

- Virtual Footprinting, que analiza una región promotora en búsqueda de patrones de reconocimiento de proteínas regulatorias (<http://www.prodoric.de/vfp/>, Münch y col., 2005, Richard Münch, Institute of Microbiology, Technical University of Braunschweig)

El modelado estructural de proteínas se realizó mediante el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) y el programa DeppView-Swiss Pdb-Viewer v4.0.4 (<http://spdbv.vital-it.ch/>) (Arnold y col., 2006; Kiefer y col., 2009; Peitsch, 1995; Schwede y col., 2003; Guex y Peitsch, 1997). La metodología de trabajo para obtener el modelado de la estructura tridimensional de las proteínas de interés se realizó siguiendo las instrucciones descritas en Bordoli y col. (2009) y los manuales de uso del servidor y el programa utilizados. Brevemente, el procedimiento consistió en la búsqueda de proteínas homólogas con estructuras conocidas por cristalografía de rayos X o RMN cuyos datos se encuentran depositados en el Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Estas proteínas luego se utilizaron como molde para el modelado de la estructura de las proteínas de interés.

3.19-Análisis de datos

3.19.1-Procesamiento de las imágenes

Las imágenes de los geles de agarosa, los geles de poliacrilamida, las membranas de nitrocelulosa, las fotos de placas de Petri y de hojas de plantas infiltradas, las autorradiografías escaneadas, etc., se procesaron con los programas Adobe Photoshop y Corel DRAW 12.

3.19.2-Cuantificación de las bandas

La cuantificación de la intensidad de las bandas de proteínas y ADN observadas en los geles de poliacrilamida y los geles de agarosa se realizó con el software Gel-Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics) o Image Quant.

3.19.3-Análisis estadístico

El análisis de datos, ANOVA y los gráficos presentados en el trabajo se hicieron con la planilla de cálculo Microsoft Office Excel.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EFECTORAS DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI

4. CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EFECTORAS DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI*

4.1-Introducción y Antecedentes

4.1.1-Proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090. Características

De las numerosas proteínas efectoras o proteínas efectoras putativas codificadas en el genoma secuenciado y publicado de Xac, en nuestro laboratorio se planteó el objetivo de investigar el rol de las proteínas AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090. Se decidió investigar su rol en la patogenicidad y su posible interacción con proteínas de *Citrus sinensis* a fin de caracterizar posibles blancos de acción de estas proteínas que conducen al desarrollo de la cancrrosis de los cítricos. La falta de mayor información relacionada con estas proteínas y el reciente descubrimiento de una amplia distribución entre distintos patovares de *Xanthomonas* sugieren que tienen un rol crucial en la especificidad de hospedador (Hajri y col., 2009) y confirman la importancia de entender su rol en los procesos de patogenicidad.

Las proteínas efectoras seleccionadas para el estudio en el laboratorio fueron AvrXacE1 (XAC0286), AvrXacE2 (XAC3224) y Xac3090 (XAC3090), que poseen alta homología con proteínas efectoras de otros fitopatógenos. AvrXacE1 y AvrXacE2 poseen 401 y 356 aminoácidos en su secuencia, respectivamente y contienen un único sitio de *N*-miristoilación en su región *N*-terminal (figura 4.1). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), el agente causal de la mancha bacteriana en pimiento, tiene proteínas ortólogas a AvrXacE1 y AvrXacE2: XopE1 y XopE2, que son 92 % y 97 % idénticas con las proteínas de Xac, respectivamente. XopE1 y XopE2 son dirigidas a la membrana plasmática de la célula vegetal, probablemente debido al motivo de *N*-miristoilación que poseen y que las asocia a las membranas (Thieme y col., 2007). AvrXacE1 y AvrXacE2 también muestran similitud con: AvrPphE, una proteína efectora de *Pseudomonas syringae*, AvrXccE1 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y otras proteínas efectoras putativas de otras bacterias fitopatógenas. Estas proteínas contienen la tríada catalítica cisteína, histidina, ácido aspártico (figura 4.1) presente en proteínas del tipo péptido-*N*-glicanasas (PNGasas) (Nimchuk y col., 2007). Xac3090 es una proteína de 497 aminoácidos y posee repeticiones ricas en leucina (dominio LRR) (figura 4.1). Este motivo, también presente en proteínas eucariotas y algunas proteínas R que median respuestas de

defensa, estaría involucrado en interacciones proteína-proteína (Kobe y Deisenhofer, 1995).

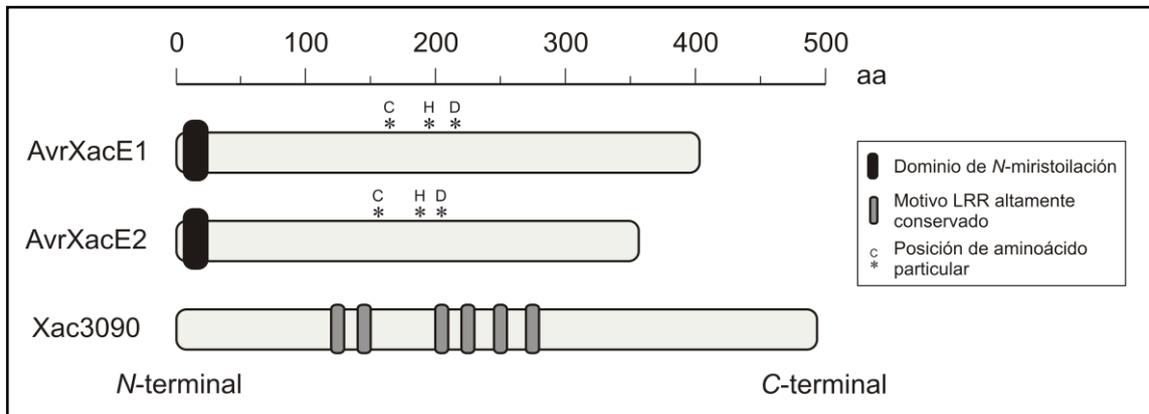


Figura 4.1. Representación esquemática de las proteínas efectoras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Se muestra un esquema de las proteínas AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 con sus principales características estructurales. La regla en la parte superior indica el número de aminoácidos. N-terminal y C-terminal muestran los extremos respectivos de las proteínas. En el recuadro se muestra a qué corresponde cada diagrama, los aminoácidos putativos cisteína (C), histidina (H) y aspártico (D) de la tríada catalítica se muestran con un asterisco, los dominios N-terminal con la señal putativa de N-miristoilación representados en negro, y en gris se muestra la localización de las repeticiones ricas en leucina (LRR) presentes en la secuencia de Xac3090.

4.1.2-Identificación de proteínas de naranja que interaccionaron con las proteínas AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 en un ensayo de interacción proteína-proteína

En un trabajo de tesis doctoral previo se identificaron proteínas de naranja que interaccionan con AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090. Mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras utilizando las proteínas efectoras como cebo o carnada contra una biblioteca de ADNc derivada de *C. sinensis* se identificaron un gran número de proteínas de la planta que interaccionarían con estas proteínas de Xac (Dunger, 2007). En general, AvrXacE1 mostró interacción con factores de transcripción y proteínas de unión a ADN y ARN. Específicamente interaccionó con proteínas de naranja homólogas a proteínas de unión a retinoblastoma (RBBP: retinoblastoma-binding protein), una proteína de unión a ARN que posee un motivo de reconocimiento de ARN (RRM: RNA recognition motif), un homólogo de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1, una ADN polimerasa dirigida por ARN, una proteína que contiene repeticiones del tipo pentatricopéptido y la proteína nuclear SKIP.

En el caso de AvrXacE2, se observó principalmente interacción con proteínas relacionadas con el sistema de ubiquitinización y chaperones moleculares. La principal interacción de AvrXacE2 fue con el dominio DNAj de las proteínas chaperonas de estrés térmico 40 (o Hsp40, del inglés Heat shock proteins). También se observó interacción con la proteína estimuladora de lesión denominada LSD1 (del inglés lesion stimulating disease) y otras proteínas chaperones con homología a las proteínas de estrés térmico pequeñas o sHsp (del inglés small Heat shock proteins), proteínas de interacción con Hsp70s y la proteína SEU1.

Xac3090 interaccionó en general con proteínas de cloroplastos. Se observó interacción con una proteína homóloga a una proteína inhibidora de apoptosis, una proteína del tipo dedos de zinc (RING-zinc-finger), una proteína ribosomal de cloroplastos, la fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptanoato aldolasa 1, la proteína de respuesta a auxina IAA13 y proteínas del complejo antena I (Dunger, 2007).

4.1.3-Construcción de cepas de *X. axonopodis* pv. *citri* mutantes en las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090

Con el objetivo de continuar estudiando el rol de las proteínas efectoras de Xac en la patogénesis y comprender los resultados del ensayo de interacción proteína-proteína mediante el sistema de doble híbrido, previamente en el laboratorio se construyeron cepas de Xac mutantes en los genes *avrXacE1*, *avrXacE2* y *xac3090*, por intercambio de marcador por doble evento de recombinación (Dunger, 2007). Las tres cepas mutantes construidas mantuvieron la capacidad de producir enfermedad al ser inoculadas en hojas de naranja. Las lesiones producidas por las cepas mutantes Δ avrXacE1 y Δ avrXacE2 presentaron una mayor área necrótica que las lesiones producidas por la cepa salvaje, mientras que la cepa Δ xac3090 produjo lesiones similares a las de Xac salvaje.

En base a estos resultados previos obtenidos en el laboratorio se decidió continuar durante el presente trabajo de tesis con el estudio de las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 para contribuir a su caracterización continuando con el estudio de las cepas mutantes en los genes que codifican estas proteínas efectoras y analizando en profundidad los resultados de interacción con proteínas de naranja para avanzar en la comprensión del rol que cumplen en la célula vegetal hospedadora durante la infección.

4.2-Complementación de cepas mutantes de *X. axonopodis* pv. *citri* en las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090

Con el objetivo de avanzar con la caracterización de las cepas mutantes de Xac Δ avrXacE1, Δ avrXacE2 y Δ xac3090, las mismas se complementaron mediante la introducción por conjugación bacteriana de las secuencias codificantes de los genes *avrXacE1*, *avrXacE2* y *xac3090* clonadas en el vector replicativo pBBR1MCS-2 como se detalla en Materiales y Métodos (sección 3.3.3). La complementación de las mutantes se verificó por resistencia al antibiótico Km, otorgada por el plásmido replicativo pBBR1MCS-2 y por amplificación por PCR de los respectivos genes con oligonucleótidos específicos. Se utilizó el par de oligonucleótidos XAC0286UK y XAC0286D2 (tabla 3.4 de Materiales y Métodos) que amplifican un fragmento de 1200 pb del gen *avrXacE1* en la cepa salvaje y en la cepa Δ avrXacE1 complementada, y un fragmento de 3200 pb en la cepa mutante Δ avrXacE1 debido a la interrupción del gen por el casete Ω de resistencia a Sp/Sm (figura 4.2A). El par de oligonucleótidos XAC3224UK y XAC3224D2 (tabla 3.4 de Materiales y Métodos) amplifica un fragmento de 1086 pb correspondiente al gen *avrXacE2* en la cepa salvaje y la cepa mutante complementada, mientras que en la cepa mutante Δ avrXacE2 amplifica un fragmento de 3686 pb debido a la interrupción del gen con el casete *aacC1* de resistencia a Gm (figura 4.2B). Los oligonucleótidos XAC3090UK y XAC3090D2 (tabla 3.4 de Materiales y Métodos) se utilizaron para amplificar un fragmento de 1485 pb correspondiente al gen *xac3090* en la cepa salvaje de Xac y la cepa mutante complementada, y uno de 4085 pb en la cepa mutante Δ xac3090 correspondiente al gen *xac3090* más el casete de resistencia a Gm (figura 4.2C). De esta manera se verificó que en la cepa salvaje y en todas las cepas mutantes complementadas se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado para cada gen efector. Para las cepas mutantes Δ avrXacE2 y Δ xac3090 (figura 4.2B y C) se obtuvieron los productos esperados de mayor tamaño debido a la inserción de los respectivos casetes de resistencia que interrumpen cada gen. En el caso de la cepa mutante Δ avrXacE1 no se detectó el fragmento esperado de mayor tamaño correspondiente al gen más el casete de resistencia Ω , pero la ausencia del fragmento de 1200 pb que se observa en la cepa salvaje y resultados previos donde se observa el producto de mayor tamaño, indican que el gen *avrXacE1* está interrumpido por el casete de resistencia. De esta manera se corroboraron molecularmente las mutaciones y complementaciones de las cepas de Xac.

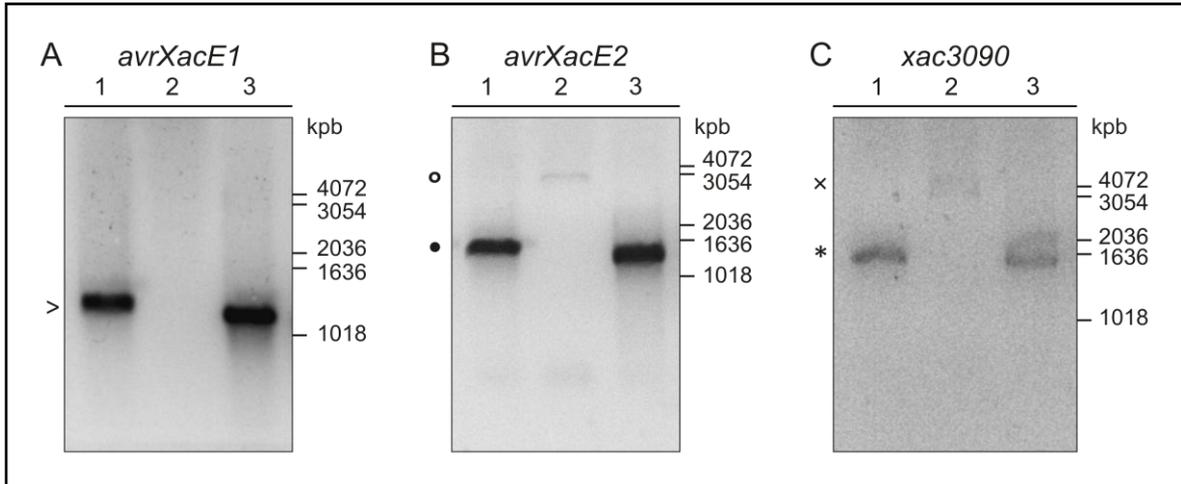


Figura 4.2. Complementación de las cepas mutantes de Xac en los genes *avrXacE1*, *avrXacE2* y *xac3090*.

Geles de agarosa para visualizar los productos de PCR amplificados con oligonucleótidos específicos para *avrXacE1* (A), *avrXacE2* (B) y *xac3090* (C). A la derecha de cada gel se indican algunas bandas del marcador de peso molecular 1kb. 1: Xacwt, 2: Xac mutante en cada gen efector, 3: cepa mutante complementada. Símbolos a la izquierda de cada gel: > *avrXacE1* de 1200 pb, • *avrXacE2* de 1086 pb, ◦ fragmento *avrXacE2* más el casete de resistencia al antibiótico presente en la cepa mutante Δ *avrXacE2*, de 3686 pb, * *xac3090* de 1485 pb, x fragmento de *xac3090* más casete de resistencia al antibiótico presente en la cepa mutante Δ *xac3090*, de 4085 pb.

4.3-Construcción de una cepa doble mutante de *X. axonopodis* pv. *citri* en las proteínas efectoras AvrXacE1 y AvrXacE2

La construcción de la cepa de Xac doble mutante en los genes que codifican para las proteínas efectoras AvrXacE1 y AvrXacE2 se realizó como se detalla en la sección 3.3.2 de Materiales y Métodos. En principio se aislaron colonias transconjugantes en medio selectivo y luego se verificó por PCR la ausencia de ambas secuencias codificantes. Para esto se usaron los mismos pares de oligonucleótidos descritos en la sección 4.2 que amplifican los genes *avrXacE1* y *avrXacE2*, respectivamente. Se realizó PCR a partir de ADN genómico de Xac salvaje, de la cepa doble mutante $Xac\Delta$ *avrXacE1/E2* y de $Xac\Delta$ *avrXacE1* para el primer par de oligonucleótidos (figura 4.3A); y de Xac salvaje, $Xac\Delta$ *avrXacE1/E2* y $Xac\Delta$ *avrXacE2* para el segundo par de oligonucleótidos (figura 4.3B). Los resultados obtenidos permiten concluir que la cepa doble mutante $Xac\Delta$ *avrXacE1/E2* no posee los genes *avrXacE1* y *avrXacE2*.

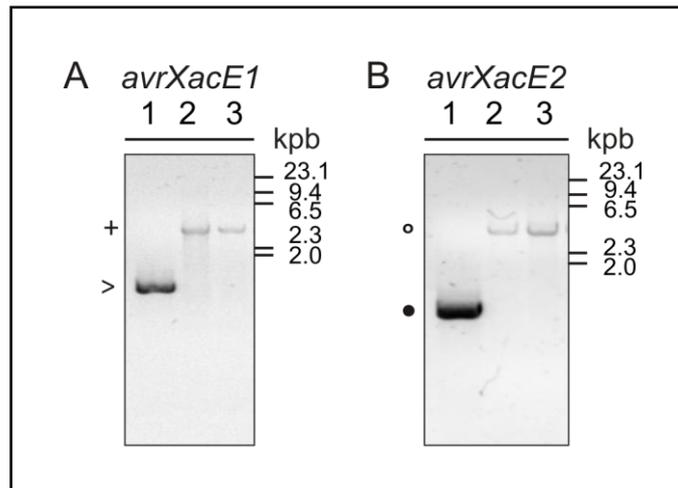


Figura 4.3. Verificación de la construcción de la cepa doble mutante *Xac*Δ*avrXacE1/E2* mediante PCR.

Geles de agarosa con los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos XAC0286UK y XAC0286D2 para verificar la mutación en el gen *avrXacE1* (A) y los oligonucleótidos XAC3224UK y XAC3224D2 para verificar la mutación en el gen *avrXacE2* (B). Como molde se utilizó ADN genómico preparado de *Xac* salvaje (1), *Xac*Δ*avrXacE1/E2* (2), y *Xac*Δ*avrXacE1* o *Xac*Δ*avrXacE2* (3), respectivamente. A la derecha de cada gel se muestran algunas bandas del marcador de peso molecular λ /HindIII. > fragmento correspondiente a *avrXacE1* de 1200 pb, + fragmento *avrXacE1* más el casete de resistencia al antibiótico presente en las cepas mutantes, de 3200 pb, • *avrXacE2* de 1086 pb, ◦ fragmento *avrXacE2* más el casete de resistencia al antibiótico presente en las cepas mutantes, de 3686 pb.

4.4- Caracterización de las cepas mutantes de *Xac* en las proteínas efectoras *AvrXacE1*, *AvrXacE2* y *Xac3090* durante la cancrrosis de los cítricos

4.4.1- Inoculación de plantas de naranja con cultivos bacterianos

Para analizar la patogenicidad y caracterizar el fenotipo de las cepas mutantes en los genes efectoras de *Xac*, la cepa salvaje junto con las cepas mutantes *Xac*Δ*avrXacE1*, *Xac*Δ*avrXacE2*, *Xac*Δ*xac3090* se inocularon en hojas de naranja (*Citrus sinensis*) en una concentración de 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM. Asimismo se inocularon las respectivas cepas complementadas (denominadas *Xac*Δ*avrXacE1c*, *Xac*Δ*avrXacE2c* y *Xac*Δ*xac3090c*) y la cepa doble mutante *Xac*Δ*avrXacE1/E2*. Como control se inoculó $MgCl_2$ 10 mM. Al igual que lo reportado en la literatura y como se muestra en la figura 4.4 la cepa salvaje de *Xac* mostró el fenotipo característico de la enfermedad, con una lesión que al principio muestra el tejido vegetal con aspecto húmedo pero que luego de varios días de infección, debido a la hipertrofia e hiperplasia celular, el tejido se rompe y la lesión se torna de aspecto seco y necrótico. A diferencia de lo observado en la naturaleza y debido a las

condiciones experimentales en las que se trabaja, no se observan canchros aislados sino que toda la zona inoculada muestra una necrosis y daño tisular general. Las cepas mutantes, $\Delta\text{avrXacE1}$, $\Delta\text{avrXacE2}$ y $\Delta\text{xac3090}$ fueron capaces de producir enfermedad. La cepa $\Delta\text{xac3090}$ produjo lesiones similares a las de Xac salvaje (figura 4.4B). La falta de diferencia en el fenotipo respecto de la cepa salvaje sugiere que Xac3090 podría modificar sutilmente la célula hospedadora pero no lo suficiente como para causar cambios visibles en el tejido infectado. Asimismo, la hipótesis de redundancia, que propone redundancia funcional entre las proteínas efectoras (Kvitko y col., 2009), también explicaría la ausencia de diferencia observada en el fenotipo de la mutante $\Delta\text{xac3090}$.

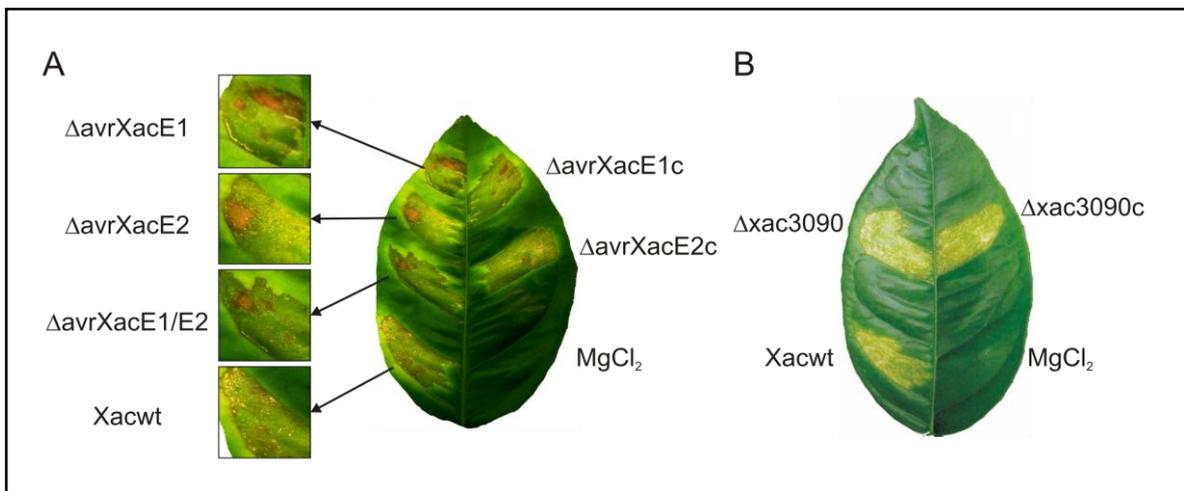


Figura 4.4. Patogenicidad de las cepas mutantes de Xac en las proteínas efectoras.

A y B: hojas de naranja inoculadas con 10^7 UFC/ml de las cepas Xac salvaje (Xacwt) y las mutantes $\Delta\text{avrXacE1}$, $\Delta\text{avrXacE2}$, $\Delta\text{avrXacE1/E2}$ y $\Delta\text{xac3090}$. También se inocularon las cepas complementadas $\Delta\text{avrXacE1c}$, $\Delta\text{avrXacE2c}$ y $\Delta\text{xac3090c}$. Se muestran hojas representativas de 8 días post inoculación. Control de infiltración: MgCl_2 10 mM. Los cuadros de la figura A muestran de manera ampliada las zonas infectadas con las cepas Xacwt, $\Delta\text{avrXacE1}$, $\Delta\text{avrXacE2}$ y $\Delta\text{avrXacE1/E2}$.

Por el contrario, las lesiones producidas por las cepas mutantes $\Delta\text{avrXacE1}$ y $\Delta\text{avrXacE2}$ presentaron una mayor área necrótica que las lesiones producidas por la cepa salvaje (figura 4.4A). La cepa doble mutante construida $\Delta\text{avrXacE1/E2}$ también conservó la capacidad de producir enfermedad en hojas de naranja pero mostró un fenotipo similar a las simples mutantes con áreas necróticas más extensas que en las lesiones producidas por la cepa salvaje (figura 4.4A). Este fenotipo sugiere que estas dos proteínas efectoras actuarían en forma separada afectando distintas vías de señalización que modifican la

necrosis del tejido vegetal, ya que la ausencia de cualquiera de ellas muestra el mismo grado de necrosis en las lesiones. Las cepas mutantes complementadas $Xac\Delta avrXacE1c$, $Xac\Delta avrXacE2c$ y $Xac\Delta xac3090c$, revirtieron el fenotipo mutante a uno similar a la cepa salvaje (figura 4.4A y B).

4.4.2-Cuantificación de las áreas de necrosis en los tejidos vegetales infectados

Debido a la diferencia observada en el tamaño del área necrótica en las lesiones producidas por las cepas mutantes en comparación con la cepa salvaje de *Xac*, se cuantificó el área de necrosis de las zonas inoculadas con dichas cepas en hojas de naranja. Para esto se inocularon 30 hojas de naranja con las distintas cepas de *Xac* y a los 8 días post inoculación se fotografiaron y se midió el área necrótica a partir de las imágenes digitalizadas con el programa Adobe Photoshop, como se detalla en Materiales y Métodos.

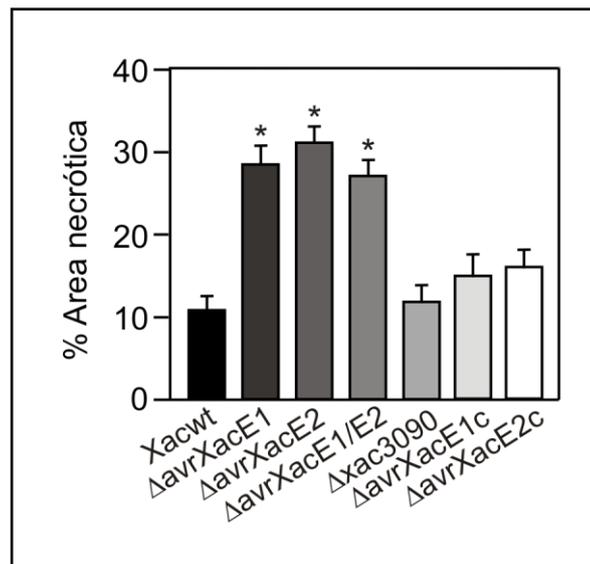


Figura 4.5. Porcentaje del área necrótica en lesiones producidas por las cepas de *Xac*.

Las áreas se midieron a partir de imágenes digitalizadas de hojas de naranja 8 días post inoculación con las cepas de *Xac*, usando el programa Adobe Photoshop. Se calcularon los valores promedios del área necrótica por área infectada y los desvíos estándar para cada cepa inoculada. Los * indican valores con diferencia estadísticamente significativa respecto de la cepa salvaje ($p < 0,01$).

Las lesiones producidas por la infiltración de las mutantes $\Delta avrXacE1$, $\Delta avrXacE2$ y $\Delta avrXacE1/E2$ presentaron un aumento mayor de dos veces en el área necrótica respecto de la cepa salvaje de *Xac*. Por el contrario no se observó diferencia significativa ($p < 0,01$) en la necrosis de las lesiones producidas por la mutante $\Delta xac3090$ en comparación con la

cepa salvaje (figura 4.5). Las cepas complementadas $\Delta avrXacE1c$ y $\Delta avrXacE2c$ no mostraron diferencias significativas respecto de la cepa salvaje, demostrando que reversionen los fenotipos mutantes a uno similar al de la cepa salvaje.

4.4.3-Análisis del crecimiento bacteriano *in planta*

A fin de determinar el rol de las proteínas efectoras de Xac en el crecimiento bacteriano durante el desarrollo de la cancrrosis de los cítricos, se realizaron curvas de crecimiento *in planta* mediante recuentos de las distintas cepas luego de inocular hojas de naranja con suspensiones bacterianas de 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM. A distintos tiempos post inoculación se tomaron muestras de tejido vegetal para realizar los recuentos bacterianos como se detalla en la sección 3.9 de Materiales y Métodos y los datos obtenidos se expresaron en log de UFC/cm² de tejido infectado, teniendo en cuenta el área del disco de hoja cortado. En la figura 4.6A se muestra una curva de crecimiento realizada para Xac salvaje y las cepas mutantes. Durante los primeros 7 días de infección la cepa Xacwt y Xac $\Delta xac3090$ crecieron más rápido que el resto de las cepas alcanzando valores de 2×10^{10} UFC/cm² a los 6 días post inoculación. Las cepas mutantes Xac $\Delta avrXacE1$, Xac $\Delta avrXacE2$ y Xac $\Delta avrXacE1/E2$ crecieron más lentamente alcanzando valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) respecto de Xacwt, de 7×10^9 , 3×10^9 y 2×10^9 UFC/cm², respectivamente (figura 4.6A). Esta diferencia de crecimiento entre la cepa salvaje y la mutante $\Delta xac3090$ con el resto de las cepas mutantes en las otras proteínas efectoras se mantuvo hasta aproximadamente los 10 días post inoculación. En la figura 4.6B se muestran las curvas de crecimiento *in planta* de las cepas mutantes complementadas en comparación con la cepa salvaje. Si bien se observó un retardo en el crecimiento de las cepas complementadas en los primeros días post inoculación, rápidamente alcanzaron valores de UFC/cm² similares a la cepa salvaje a los 6 días post inoculación. Luego de los 20 días post inoculación todas las cepas alcanzaron una densidad celular de 2×10^{11} UFC/cm², luego de lo cual el crecimiento comenzó a decaer lentamente (dato no mostrado). Considerando que Xac es un patógeno biotrófico que requiere de tejido vegetal vivo para su crecimiento, los resultados de estas curvas de crecimiento son consistentes con los fenotipos observados en plantas infectadas con estas cepas dado que el aumento en el área necrótica de las lesiones producidas por Xac $\Delta avrXacE1$, Xac $\Delta avrXacE2$ y Xac $\Delta avrXacE1/E2$ soporta un menor crecimiento bacteriano.

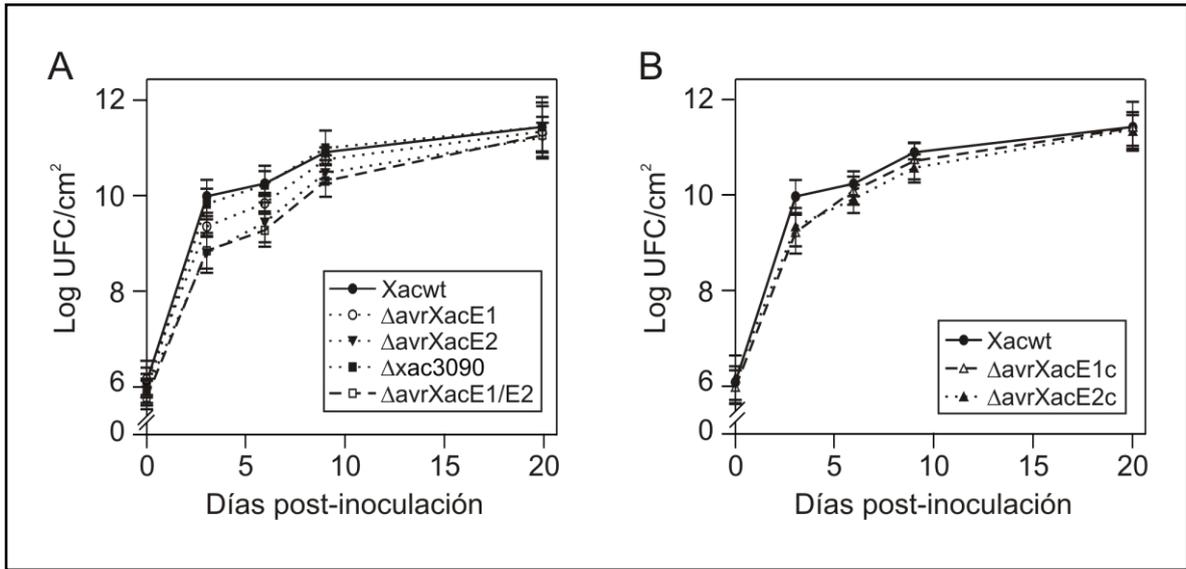


Figura 4.6. Curvas de crecimiento bacteriano en hojas de naranja.

Recuento de células bacterianas a partir de hojas inoculadas con 10^7 UFC/ml de las cepas Xac salvaje (Xacwt), y las mutantes Δ avrXacE1, Δ avrXacE2, Δ avrXacE1/E2 y Δ xac3090 (A) y las cepas complementadas Xac Δ avrXacE1c y Xac Δ avrXacE2c (B). El crecimiento bacteriano se monitoreó durante 20 días y se expresó como UFC por cm^2 de tejido infectado. Los valores representan el promedio de tres muestras por cepa provenientes de tres plantas diferentes, y cada experimento se repitió tres veces. Los resultados se analizaron mediante ANOVA.

4.5- Caracterización de las cepas mutantes en las proteínas efectoras de Xac en la inducción de respuesta hipersensible en plantas no hospedadoras

Con el objetivo de determinar si las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 contribuyen con el desarrollo de la respuesta hipersensible (HR) en plantas no hospedadoras de Xac, se analizó el comportamiento de la cepa salvaje, las mutantes Δ avrXacE1, Δ avrXacE2, Δ xac3090 y la doble mutante Δ avrXacE1/E2 en una interacción incompatible con plantas no hospedadoras de tomate y algodón. Las hojas de tomate y algodón se inocularon con una concentración de 10^7 UFC/ml de cada cepa y como control se inoculó MgCl_2 10 mM. En todos los casos se observó desarrollo de la respuesta de tipo HR a las 24 hs post infiltración, y para todas las cepas la intensidad de la respuesta fue igual (figura 4.7A y B), indicando que la presencia de estas proteínas efectoras no es esencial para el desarrollo de la respuesta HR en plantas no hospedadoras.

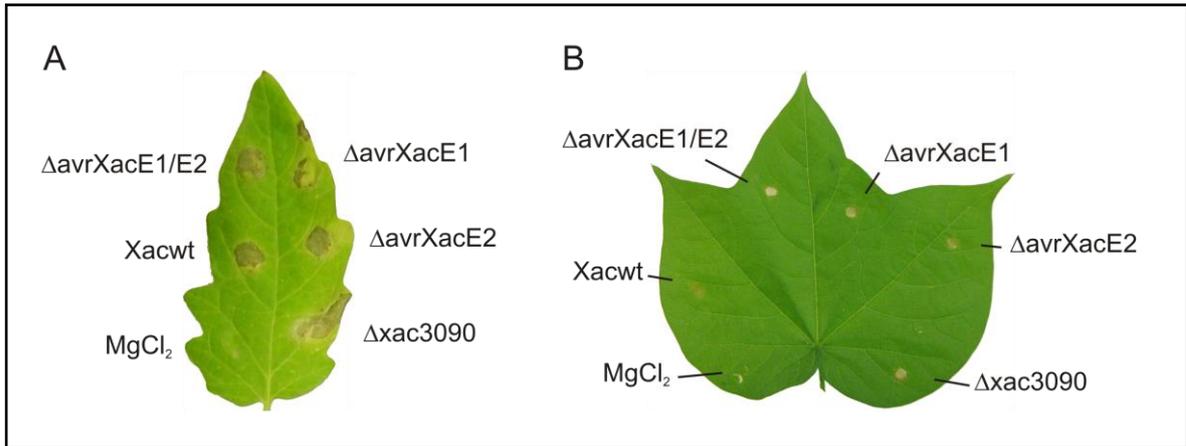


Figura 4.7. Respuesta HR producida en hojas de plantas no hospedadoras por las cepas de Xac mutantes en los genes efectores.

Se inocularon hojas de tomate (A) y de algodón (B) como plantas no hospedadoras de Xac con la cepa salvaje de Xac (Xacwt), las cepas mutantes Xac Δ avrXacE1, Xac Δ avrXacE2, Xac Δ xac3090 y Xac Δ avrXacE1/E2 en una concentración de 10^7 UFC/ml. Como control se infiltró MgCl₂ 10 mM. Las fotos corresponden a hojas de 24 hs post inoculación.

4.6-Localización subcelular de las proteínas efectoras bacterianas AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 en células vegetales

Una manera de dilucidar la función que cumplirían las proteínas efectoras de Xac dentro de la planta es evaluar la localización subcelular de los efectores de Xac en el interior de las células vegetales. Para esto las secuencias codificantes de AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 se clonaron fusionadas al extremo *N*-terminal de la proteína fluorescente verde GFP en el vector de expresión en planta pCHF3 (sección 3.6 de Materiales y Métodos). Células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con estos vectores fueron infiltradas en hojas de *Nicotiana benthamiana* y mediante un microscopio de barrido láser confocal se observó la fluorescencia de las proteínas de fusión a GFP 24 hs post inoculación. AvrXacE1-GFP y AvrXacE2-GFP se localizaron principalmente en núcleo y membrana plasmática (figura 4.8). Esta localización sugiere que las mismas podrían interactuar con proteínas de la célula hospedadora que se localicen en el núcleo, como factores de transcripción o proteínas de unión a ADN y ARN, lo cual concuerda con los resultados de interacción proteína-proteína obtenidos previamente en el ensayo de doble híbrido. Además, ambas proteínas poseen motivos de *N*-miristoilación en el extremo *N*-terminal de su secuencia aminoacídica que permitirían

su asociación con las membranas celulares y esto explicaría la localización en membranas de las proteínas de fusión a GFP.

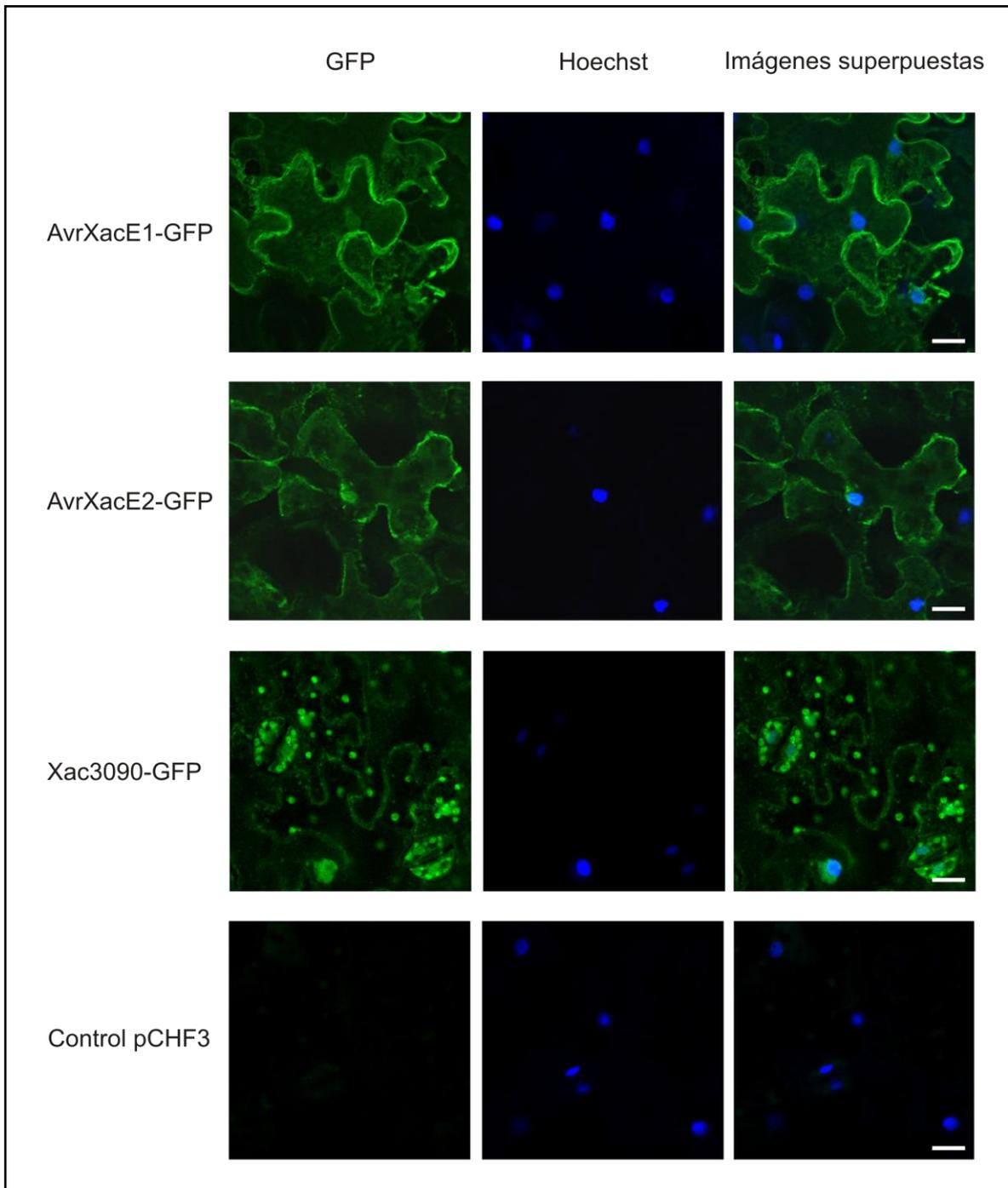


Figura 4.8. Detección y localización subcelular de las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 fusionadas a GFP.

Imágenes del microscopio confocal de hojas de *N. benthamiana* 24 hs post agroinfiltración con cepas transformadas con los vectores pCHF3 que expresan las proteínas de fusión y con el vector pCHF3 vacío. GFP: visualización de la fluorescencia emitida por GFP en las proteínas de fusión, Hoechst: visualización de la fluorescencia emitida por los núcleos celulares teñidos con el colorante Hoechst, Imágenes superpuestas: imágenes GFP y Hoechst superpuestas. Barra blanca: 15 μ m.

La proteína de fusión Xac3090-GFP también se observó asociada a los núcleos de las células vegetales (figura 4.8). Sin embargo, la principal localización subcelular de Xac3090-GFP fue en los cloroplastos (figura 4.9). Este resultado también concuerda con los resultados obtenidos en la interacción proteína-proteína en levadura, la localización cloroplástica de Xac3090 le permitiría interactuar, entre otras, con proteínas del fotosistema y cloroplásticas. La tinción de núcleos con el colorante Hoechst se realizó para confirmar la co-localización de la fluorescencia azul del colorante con la fluorescencia verde de GFP (figura 4.8). A fin de verificar la localización en cloroplastos de Xac3090 se identificaron estas organelas por la autofluorescencia roja de la clorofila y se corroboró la co-localización de la misma con la fluorescencia verde de GFP (figura 4.9).

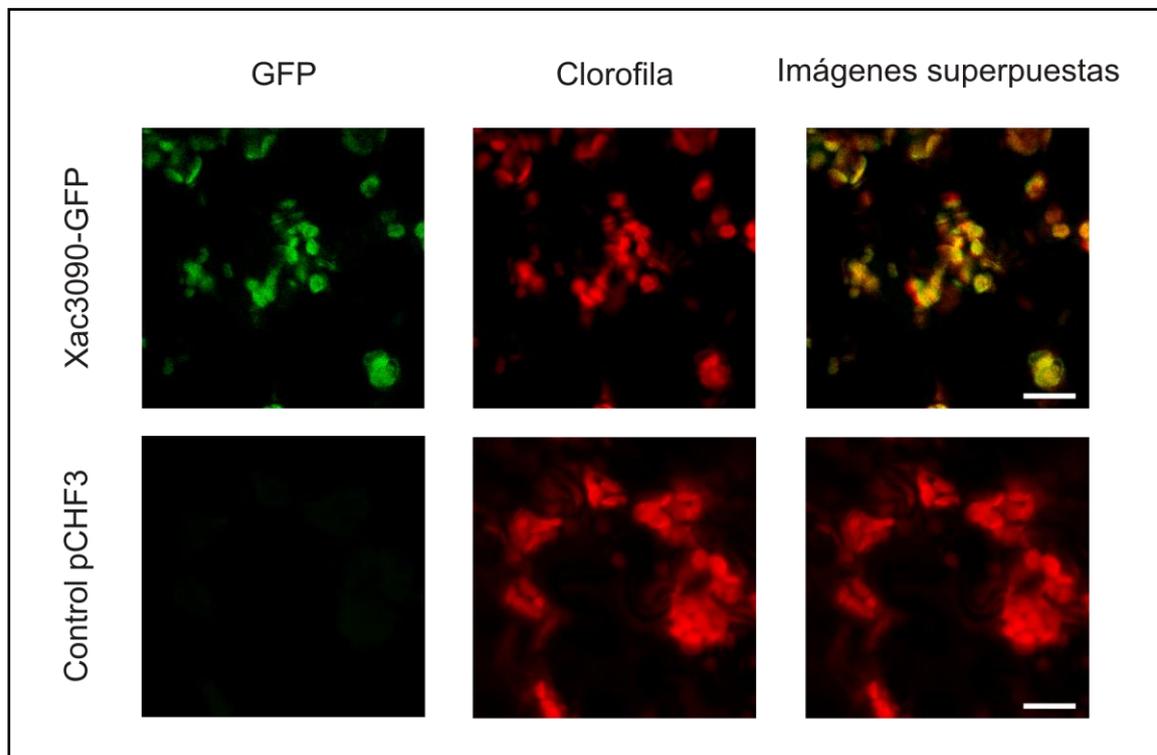


Figura 4.9. Localización en cloroplastos de la proteína Xac3090-GFP.

Imágenes del microscopio confocal que muestran la localización de Xac3090-GFP en hojas de *N. Benthamiana* 24 hs post agroinfiltración. Las plantas fueron agroinfiltradas con los vectores pCHF3-Xac3090-GFP y con el vector pCHF3 vacío. GFP: visualización de la fluorescencia emitida por GFP en la proteína de fusión Xac3090-GFP, Clorofila: visualización de la fluorescencia roja emitida por la clorofila presente en los cloroplastos de las células vegetales, Imágenes superpuestas: imágenes GFP y Clorofila superpuestas. Barra blanca: 15 μ m.

4.7-Análisis del rol de la proteína Xac3090 en la eficiencia fotosintética de cloroplastos

4.7.1-Determinación del contenido de pigmentos

Los resultados previos de localización subcelular de Xac3090 en el interior de las células vegetales sugieren que esta proteína podría alterar ciertos parámetros fisiológicos de los cloroplastos durante el desarrollo de la infección. Por lo tanto se decidió caracterizar algunos parámetros fotosintéticos, específicamente en este caso el contenido de clorofila a, clorofila b y carotenoides en hojas de naranja inoculadas con la cepa salvaje de Xac y la cepa mutante Xac Δ xac3090. Se observó una importante disminución en el contenido de pigmentos en los tejidos infectados con ambas cepas en relación con tejidos inoculados con MgCl₂ 10 mM como control, pero no se observaron diferencias significativas en el contenido de pigmentos entre la cepa salvaje y mutante de Xac ($p < 0,05$) (figura 4.10).

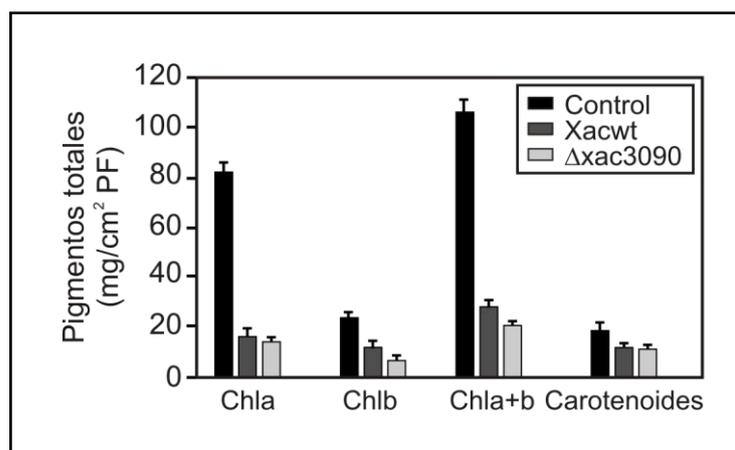


Figura 4.10. Determinación del contenido de pigmentos en hojas de naranja inoculadas con Xac salvaje (Xacwt) y Xac Δ xac3090.

Las cepas se infiltraron a una concentración de 10^7 UFC/ml en MgCl₂ 10 mM que también se utilizó como control de infiltración. Se determinaron los pigmentos clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y carotenoides. Se grafican los valores promedio con sus respectivos desvíos estándar. PF: peso fresco.

4.7.2-Determinación de parámetros fotosintéticos

Posteriormente, se analizó si la eficiencia fotosintética se encontraba alterada en tejidos vegetales infectados con la cepa Xac Δ xac3090 respecto de la cepa salvaje. Para ello se determinaron los parámetros fotosintéticos eficiencia cuántica máxima del

fotosistema II (FSII) (F_v/F_m), eficiencia máxima del FSII a una determinada intensidad de luz (F'_v/F'_m) medida a $100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la eficiencia operativa del FSII (ΦFSII) y se calcularon como se detalla en Materiales y Métodos a las 72, 96 y 144 hs post inoculación con ambas cepas. Se observó una notable disminución de estos parámetros en las hojas inoculadas con ambas cepas respecto a las hojas inoculadas con el control (MgCl_2 10 mM) pero no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas ($p < 0,05$) (figura 4.11).

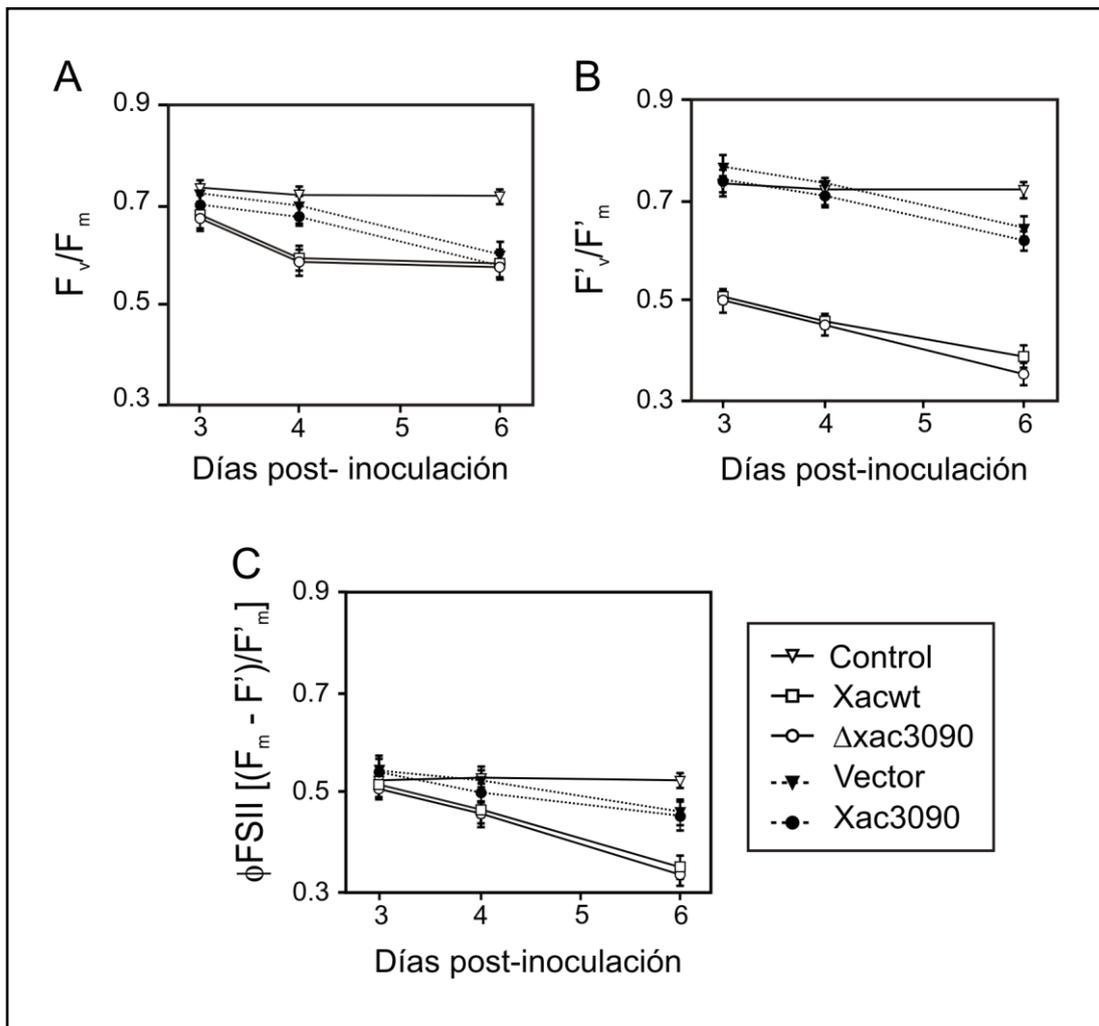


Figura 4.11. Determinación de parámetros fotosintéticos.

Eficiencia cuántica potencial del FSII (F_v/F_m) (A), eficiencia cuántica efectiva del FSII (F'_v/F'_m) (B) y eficiencia operativa del FSII (ΦFSII) (C). A-C: parámetros de fluorescencia de la clorofila determinados en hojas de naranja infiltradas con MgCl_2 10 mM (Control), las cepas Xac salvaje (Xacwt), Xac $\Delta\text{xac3090}$ ($\Delta\text{xac3090}$) y *A. tumefaciens* con el vector pCHF3 vacío (Vector) y conteniendo la secuencia codificante de la proteína de fusión Xac3090-GFP (Xac3090). Los valores son promedios de cinco replicados y las barras representan las desviaciones estándar correspondientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA ($p < 0,05$).

A continuación, y a fin de profundizar la capacidad de Xac3090 de modificar los parámetros fotosintéticos, se determinó si la proteína Xac3090 es capaz de alterar dichos parámetros. Para ello, se expresó transientemente en hojas de naranja la proteína Xac3090 mediante agroinfiltración con la cepa de *A. tumefaciens* transformada con el vector pCHF3 que contiene la proteína de fusión Xac3090-GFP utilizada previamente en los ensayos de localización celular. Esta técnica se utilizó recientemente para evaluar el efecto de una proteína Avr en *Citrus paradisi* (Figueiredo y col., 2011). Se determinaron los mismos parámetros fotosintéticos que para la inoculación con las cepas de Xac. En la figura 4.11 se puede apreciar que no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las hojas que expresaban transientemente Xac3090-GFP y aquellas que fueron agroinfiltradas con el vector pCHF3 vacío. Sin embargo, con ambas agroinfiltraciones, se vieron disminuidos los parámetros fotosintéticos, probablemente debido a la inoculación con *A. tumefaciens*.

A pesar de que los ensayos de localización subcelular (figuras 4.8 y 4.9) y de que las proteínas de planta encontradas que interaccionan con Xac3090 sugieren que esta proteína efectora se localizaría en los cloroplastos vegetales, no se observaron efectos directos sobre la eficiencia fotosintética que puedan atribuirse a Xac3090. Si se tiene en cuenta el fenotipo observado cuando la cepa Xac Δ xac3090 es inoculada en hojas de naranja (figura 4.4) y la curva de crecimiento *in planta* (figura 4.6), que muestran características muy similares a la cepa salvaje, es de esperar que no se vea afectado ningún parámetro fotosintético así como tampoco una alteración en el contenido de pigmentos, en comparación con una infección normal con la cepa salvaje. Esto sugiere que la función de Xac3090 en los cloroplastos de las células hospedadoras podría depender también de otra proteína efectora de Xac que actúe de manera concertada.

4.8-Discusión

Al igual que otras bacterias patógenas Gram negativas, Xac utiliza el sistema de secreción de proteínas tipo III para introducir proteínas efectoras dentro de las células hospedadoras. A pesar de que el rol de muchas de estas proteínas todavía no se conoce, algunas pueden suprimir la respuesta inmune innata (White y col., 2009). Sólo un número limitado de estudios se han llevado a cabo sobre la caracterización bioquímica y funcional de las proteínas efectoras de fitopatógenos (Grant y col., 2006; White y col., 2009). El hecho de que mutaciones simples en un solo gen efector en *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Castañeda y col., 2005; Jiang y col., 2009) y *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Kvitko y col., 2009) no mostraron un efecto en el fenotipo de virulencia, sugiere que las proteínas efectoras de tipo III pueden tener funciones redundantes en la célula hospedadora. Los resultados de este trabajo mostraron diferencias en los fenotipos de virulencia para dos de las tres proteínas efectoras analizadas. Las cepas de Xac mutantes en los genes *avrXacE1* y *avrXacE2* muestran lesiones con áreas necróticas más extensas que aquellas producidas por la cepa salvaje en hojas de naranja. Por el contrario no se observaron diferencias fenotípicas con la mutante en el gen *xac3090*. A pesar de estas diferencias fenotípicas en plantas de naranja, las tres cepas mutantes en las proteínas efectoras indujeron una respuesta HR similar a la obtenida por una infiltración con la cepa salvaje en todas las plantas no hospedadoras ensayadas, lo que sugiere que la respuesta HR es rápida y no permite observar posibles efectos sutiles de estas proteínas o que no están involucradas en la respuesta. Mutantes en las proteínas XopE1 y XopE2, ortólogos de *AvrXacE1* y *AvrXacE2* de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, no mostraron diferencias significativas en los síntomas de enfermedad o la inducción de HR cuando se compararon con la cepa salvaje (Thieme y col., 2007), lo que sugiere que en cada interacción planta-patógeno particular ocurren interacciones complejas entre el hospedador y el patógeno.

Xac es un patógeno biotrófico y por lo tanto requiere de tejido vegetal vivo que provea condiciones favorables para la multiplicación y colonización de otros nichos. Por lo tanto, el retraso temporario de la necrosis en el hospedador puede ser una ventaja para Xac. La progresión de la necrosis observada en infecciones con las mutantes en los genes *avrXacE1* y *avrXacE2* sugiere que estas proteínas pueden estar involucradas en el retardo o supresión de la necrosis en las etapas iniciales del proceso infectivo para permitir un crecimiento bacteriano más rápido y por lo tanto asegurar la colonización del patógeno.

AvrXacE1 interactúa con proteínas de unión a ADN y ARN (Dunger, 2007). En las localizaciones subcelulares en hojas de *N. benthamiana* AvrXacE1 se observó asociada a las membranas celulares y nucleares de la planta. Como esta proteína posee un motivo de *N*-miristoilación en su extremo *N*-terminal, la miristoilación podría anclar esta proteína efectora en la membrana mediante un mecanismo similar al de su homólogo XopE1 (Thieme y col., 2007). La proteína Snf1 de *Saccharomyces cerevisiae* está localizada en la membrana plasmática cuando está *N*-miristoilada, pero se transloca al núcleo cuando la *N*-miristoilación se bloquea en respuesta a una señal específica (Lin y col., 2003). Seguramente un análisis más profundo será necesario para clarificar si este tipo de regulación espacial también ocurre con AvrXacE1 en hojas infectadas por Xac.

La cepa mutante en el gen *avrXacE2* produjo una mayor necrosis que la cepa salvaje de Xac, lo que sugiere que esta proteína podría atenuar la muerte celular. Es interesante que una de las proteínas de planta con las que interacciona AvrXacE2 en el ensayo de doble híbrido en levaduras es LSD1 (Dunger, 2007). En *Arabidopsis*, LSD1 codifica un factor de transcripción con un dominio dedos de zinc específico de plantas que cumple un rol en la regulación negativa de la muerte celular, regulando la translocación del factor de transcripción AtbZIP10 (un regulador positivo de la muerte celular) entre el núcleo y el citoplasma celular (Kaminaka y col., 2006). Se puede sugerir entonces que AvrXacE2 podría modular la vía de LSD1 y por lo tanto controlar la muerte celular en la célula hospedadora. La localización dual de AvrXacE2 en la membrana plasmática celular y en el núcleo se puede explicar mediante la velocidad a la cual la translocación de este efector ocurre en las células vegetales pero necesita ser estudiada en mayor profundidad.

La función bioquímica de las proteínas efectoras ha sido difícil de determinar, existen pocos ejemplos pero algunas funciones asociadas a los efectores bacterianos comprenden actividades como tirosina fosfatasa, cisteína proteasas, quinasas e inhibidores de proteasas (Chang y col., 2004; Dangl y McDowell, 2006). Mediante análisis informático se observó que ciertas proteínas de naranja que interaccionaron con AvrXacE1 y AvrXacE2 en el ensayo de doble híbrido son capaces de ser glicosiladas. Para la proteína HopX, un homólogo de AvrXacE1 y AvrXacE2 de *P. syringae*, se determinó que su función en la patogénesis depende de una tríada de aminoácidos presente en péptido-*N*-glicanasas (PNGasas) (Nimchuk y col., 2007). AvrXacE1 y AvrXacE2 poseen esta tríada conservada de aminoácidos cisteína, histidina y ácido aspártico (CHD) (figura 4.1) y es posible que su rol en la patogénesis sea la deglicosilación de proteínas blanco regulando

de esta manera la señalización del proceso infectivo. Las PNGasas son enzimas que se encontraron por primera vez en plantas y luego en bacterias, animales y levaduras (Takahashi y Nishibe, 1978; Plummer y col., 1984; Berger y col., 1995; Suzuki y col., 1998). Son miembros de la superfamilia de transglutaminasas (TGasas), y utilizan la tríada catalítica CHD para escindir el enlace amida entre *N*-acetil-glucosamina y un residuo de asparagina de *N*-glicopéptidos o *N*-glicoproteínas (Suzuki y col., 2002), generando una cadena polipeptídica que contiene un ácido aspártico y un 1-amino-*N*-acetilglucosaminil oligosacárido, el cual es hidrolizado a pH neutro para generar un *N*-acetilglucosaminil oligosacárido y amoníaco. Las células eucariotas poseen un sistema llamado “degradación asociada al retículo endoplasmático” (ERAD, del inglés endoplasmic reticulum-associated degradation), para eliminar proteínas recién sintetizadas pero mal plegadas o ensambladas. La célula retrotransloca dichas proteínas defectuosas, incluyendo *N*-glicoproteínas, desde el retículo endoplasmático al citosol donde son degradadas por el proteasoma. Wiertz y colaboradores fueron los primeros en indicar la participación de PNGasas citoplasmáticas en el sistema ERAD, y actualmente se conocen diversos sustratos del sistema ERAD que son deglicosilados por PNGasas durante el proceso de degradación (Wiertz y col., 1996; Suzuki y col., 2002). Durante el trabajo de tesis se diseñó un protocolo para ensayar la actividad PNGasa de las proteínas de Xac, en base a distintos protocolos encontrados en la bibliografía (Suzuki, 2005; Kwan y col., 2005), sin embargo en ningún caso se pudo observar un resultado positivo que indique la presencia de actividad deglicosilasa en AvrXacE1 y AvrXacE2. En el caso de HopX, tampoco se pudo detectar *in vitro* la actividad enzimática, aunque las evidencias bioinformáticas y genéticas sugieren que esta familia de proteínas efectoras de *P. syringae* codifica enzimas activas de la familia TGasas (Nimchuk y col., 2007).

La proteína efectora bacteriana Xac3090 interacciona principalmente con proteínas cloroplásticas (Dunger, 2007). Estos resultados nos llevaron a especular que Xac3090 podría alterar la maquinaria fotosintética, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de pigmentos o los parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos cuando la cepa mutante de Xac Δ xac3090 se inoculó en hojas de naranja, o incluso luego de la expresión transiente de Xac3090-GFP. Esto sugiere que el efecto de Xac3090 es muy sutil para ser detectado con las técnicas utilizadas o que se necesitan acciones coordinadas espacio-temporalmente de otras proteínas efectoras para causar modificaciones en esta organela específica de la planta. En los ensayos de

localización subcelular Xac3090 se encontró en el núcleo y en los cloroplastos de células de *N. benthamiana*. Existen algunos factores de transcripción nucleares llamados proteínas Whirly, las cuales son dirigidas a núcleo y también a cloroplastos y mitocondria, y podrían estar involucradas en la comunicación entre el núcleo y las organelas en las células vegetales (Schwacke y col., 2007). Además, se ha propuesto recientemente que las proteínas pueden ser relocalizadas de un compartimiento a otro en respuesta a cambios ambientales, y que el direccionamiento dual puede funcionar para el almacenamiento o secuestro de factores de transcripción dentro de las organelas hasta que determinadas condiciones específicas requieran de su actividad en el núcleo (Krause y Krupinska, 2009).

Existen distintos métodos para corroborar *in vitro* las interacciones observadas en ensayos de doble híbrido en levaduras, como far western-blot o pull down, entre otros (Wu y col., 2007; Vikis y Guan, 2004). Durante el presente trabajo de tesis, varios ADNc de naranja que interaccionaron con AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 fueron clonados en vectores de expresión de la serie pET para su purificación como proteínas recombinantes fusionadas a 6 histidinas. Las proteínas efectoras se clonaron en vectores de expresión de la serie pGEX para purificarlas como proteínas de fusión a la proteína glutatión-S-transferasa (GST). Hasta el momento no se pudo obtener un resultado positivo en las interacciones ensayadas *in vitro* entre distintas proteínas efectoras y sus posibles blancos de naranja por distintos métodos. La falta de estos resultados que confirmen las interacciones observadas en el ensayo de doble híbrido dificulta la asignación de un rol específico para cada proteína efectora, si bien los ensayos de localización subcelular permitieron abrir un camino para continuar la búsqueda de la función de dichas proteínas en la célula hospedadora durante el desarrollo de la enfermedad.

El género *Xanthomonas* comprende un grupo de bacterias patógenas de plantas que causan marchitamiento, canchales y manchas en las hojas. A pesar de que el rango de hospedador de este género es amplio, patovares particulares pueden estar confinados a una planta hospedadora específica, y la variedad de proteínas efectoras presentes en un determinado patógeno pueden determinar la especificidad de hospedador y de tejido (White y col., 2009). En particular para *Xanthomonas axonopodis*, un estudio de 132 cepas representativas de 18 patovares distintos con diferentes rangos de hospedador y una amplia distribución geográfica, reveló una correspondencia entre la composición del repertorio efector y los patovares, dando sustento a la idea de que la especificidad de hospedador resulta de la interacción entre un repertorio de genes de virulencia

bacteriana y un repertorio de genes involucrados en la defensa del hospedador (Hajri y col., 2009). Resulta interesante que todas las cepas caracterizadas de Xac poseen los tres genes analizados en este trabajo, mientras que dos de las cepas caracterizadas de *X. axonopodis* pv *aurantifolii*, que también causan la cancrrosis de los cítricos sólo en limones y lima Mexicana (Brunings y Gabriel, 2003), no poseen una copia funcional de AvrXacE1 (Hajri y col., 2009). Incluso, en cepas de la bacteria fitopatógena relacionada filogenéticamente *X. axonopodis* pv. *citrumelo* que causa la mancha bacteriana de cítricos (Brunings y Gabriel, 2003; Graham y col., 2004), AvrXacE2 está presente en tres de las seis cepas analizadas, mientras que Xac3090 y AvrXacE1 están ausentes (Hajri y col., 2009). Por lo tanto, el rango de hospedador puede explicarse en parte por estos complejos repertorios de efectores y, específicamente en el caso de la cancrrosis de los cítricos, el estudio de la localización de las proteínas efectoras de Xac en la célula vegetal, y las proteínas de la planta con las cuales interaccionaron, puede ser relevante en el diseño de futuras estrategias de control de la enfermedad.

CAPITULO II

*PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA
REGULATORIA HRPG EN LA VIRULENCIA Y
PATOGENICIDAD DE XANTHOMONAS
AXONOPODIS PV. CITRI*

5. CAPITULO II: PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA REGULATORIA HRPG EN LA VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI*

5.1-Introducción

El sistema de secreción de proteínas tipo tres (SSTT), codificado en las bacterias patógenas Gram-negativas por el cluster denominado *hrp*, también es utilizado por el fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) en la patogenicidad y virulencia (Alfano y Collmer, 1997; Büttner y Bonas, 2002). Bacterias mutantes en este sistema de secreción no son capaces de multiplicarse en los tejidos vegetales de plantas hospedadoras, lo que impide la colonización de la planta y la posterior dispersión del patógeno y tampoco son capaces de inducir respuesta hipersensible (HR) en plantas hospedadoras resistentes o plantas no hospedadoras (Alfano y Collmer, 1997; Dunger y col., 2005). La estructura compleja del SSTT (sección 1.6 de Introducción) permite el anclaje de la bacteria a la membrana plasmática de la célula vegetal hospedadora para promover la translocación de proteínas efectoras y de otros elicitores y factores de virulencia directamente en el interior de la célula vegetal que favorecen la colonización de los tejidos, la dispersión de la bacteria y en consecuencia el desarrollo de la enfermedad en el caso de plantas sensibles al patógeno (Weber y col., 2005).

El cluster *hrp* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) es el más estudiado hasta el momento (Wengelnik y col., 1996b; Rossier y col., 2000) y sirve como modelo para el estudio de este aparato de secreción en otras *Xanthomonas*. La expresión de los genes del cluster está regulada por las proteínas regulatorias HrpG y HrpX. La transcripción génica del cluster se induce *in planta* y en medios de cultivo mínimos a través de estas proteínas, mediante la activación de HrpG, necesaria para la activación de HrpX que luego activa otros operones y genes del cluster. El modelo regulatorio del cluster *hrp* propuesto para Xcv y descrito en detalle en la sección 1.6 de Introducción, muestra que HrpG cumpliría un rol esencial en la activación del cluster y la expresión del SSTT (Wengelnik y col., 1996b). Varios estudios, además relacionan a esta proteína con la regulación de distintas vías de expresión de factores de virulencia, exoenzimas, metabolitos, etc, indicando una posible función como un regulador maestro de la patogenicidad de Xac y otras bacterias patógenas (Büttner y Bonas, 2010).

En este contexto, y ante la falta de evidencias experimentales acerca del rol de HrpG específicamente en la cancrrosis de los cítricos producida por Xac, se decidió investigar el rol de esta proteína como regulador del SSTT, para comprender además su función como responsable de la translocación de proteínas efectoras y otras moléculas que facilitan la colonización de plantas cítricas.

5.2-Construcción de una cepa de *X. axonopodis* pv. *citri* sobreexpresante del gen *hrpG*

A fin de estudiar el rol de la proteína regulatoria HrpG del SSTT, se construyó una cepa de Xac sobreexpresante del gen *hrpG*. Para esto, se clonó la secuencia codificante de HrpG amplificada con oligonucleótidos específicos bajo el control del promotor constitutivo *lacZ* del vector replicativo pBBR1MCS-3, como se detalla en la sección 3.3.4 de Materiales y Métodos. Las colonias transformantes obtenidas de cepas de *E. coli* JM109 se verificaron por PCR, minipreparación de plásmido y liberación del fragmento clonado mediante digestiones con enzimas de restricción, y en todos los casos se obtuvo un fragmento esperado de 888 pb que contiene la secuencia codificante de *hrpG* de 792 pb. Posteriormente se transformó la cepa movilizadora *E. coli* S17-1 y se conjugó con la cepa de Xac salvaje. Las cepas transconjugantes de Xac se seleccionaron por resistencia al antibiótico tetraciclina e inmediatamente se crecieron en medio líquido y se inocularon en hojas de naranja a una concentración de 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM. La sobreexpresión de *hrpG* y mutantes puntuales en la secuencia del gen que expresan constitutivamente el cluster *hrp* de Xcv, producen lesiones igual o más virulentas que la cepa salvaje (Wengelnik y col., 1999), pero inesperadamente, algunas cepas sobreexpresantes obtenidas en Xac, como los clones 7, 8, 14 y 30, no mostraron síntomas de cancrrosis a diferencia de la inoculación con Xac salvaje (figura 5.1). La lesión producida por esos clones no mostraba signos severos de necrosis, por el contrario se observó una leve clorosis en el tejido infectado que a pesar de largos períodos de inoculación no alcanzaron a desarrollar los síntomas característicos de las infecciones con Xac salvaje. El clon 17, a diferencia de los otros, mostraba un fenotipo similar a la cepa salvaje.

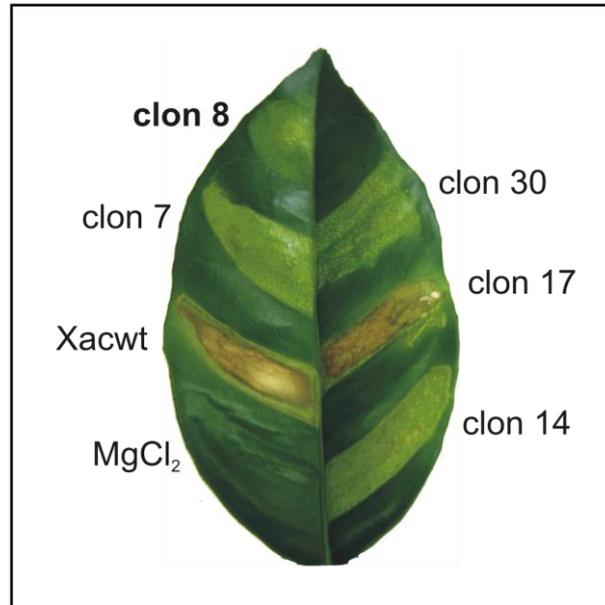


Figura 5.1. Inoculación de cepas transconjugantes de Xac.

Se inocularon hojas de naranja con 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM que además se utilizó como control de infiltración. Se muestra una foto representativa de una hoja de naranja 15 días post inoculación con la cepa salvaje de Xac (Xacwt), y los clones 7, 8, 14, 17 y 30 de las cepas obtenidas por conjugación bacteriana.

Frente a estos fenotipos observados se decidió secuenciar la construcción en el plásmido pBBR1MCS-3 con la cual se habían construido estas cepas sobreexpresantes de Xac. Luego de analizar la secuencia obtenida y de alinearla con la secuencia publicada en la base de datos GenBank del gen *hrpG* del genoma secuenciado de Xac (da Silva y col., 2002), se encontró una mutación puntual en la secuencia nucleotídica, seguramente introducida por error por la ADN polimerasa con la cual se amplificó la secuencia de *hrpG* a partir de ADN genómico de Xac salvaje. La mutación encontrada consiste en el cambio de la base citosina en la posición 628 de la secuencia por una base de timina (figura 5.2B). Esta mutación implica una alteración en el código genético que se traduce en un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, cambiando un residuo de arginina (Arg o R) en la posición 210 de la secuencia proteica por un residuo de cisteína (Cys o C) (figura 5.2B).

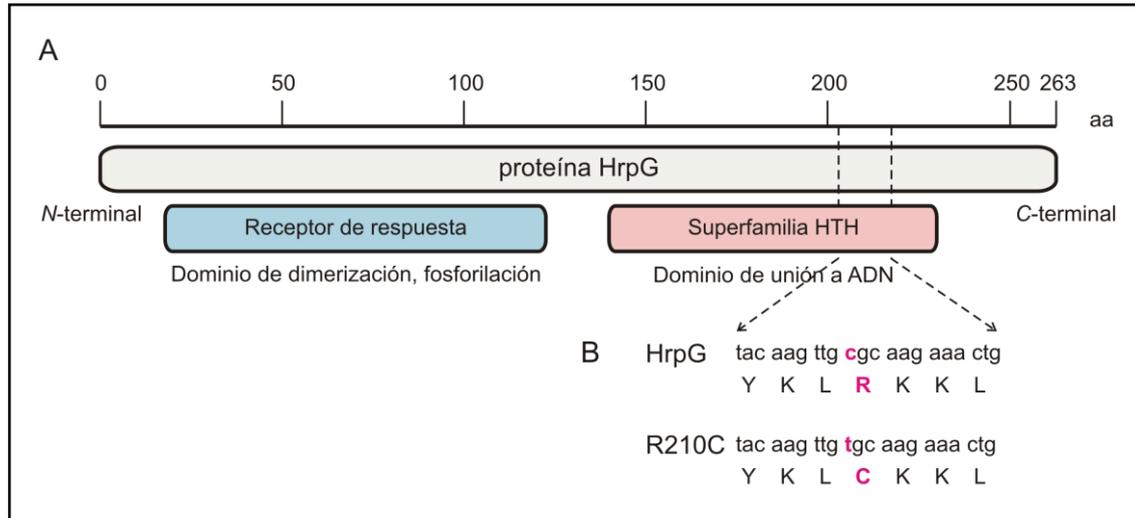


Figura 5.2. Esquema representativo de la proteína HrpG.

A: diagrama de HrpG de Xac, la regla en la parte superior representa el número de aminoácidos, se señalan los dominios conservados más importantes en la región N-terminal (azul) y C-terminal (rosa) de la proteína. B: se muestra parte de la secuencia nucleotídica (nt 619 a 639) y aminoacídica (aa 207 a 213) de HrpG y de la proteína mutante R210C. En rosa se resaltan las bases y aminoácidos mutados. Las líneas cortadas muestran la región de la proteína donde se encuentran los nt y aa detallados.

Con el objetivo de comprender el efecto de esta mutación en la estructura y función de la proteína HrpG, se comparó la secuencia proteica con la base de datos no redundante de GenBank mediante la herramienta BLAST (sección 3.18 de Materiales y Métodos). De esta manera se determinó que HrpG de Xac tiene un alto porcentaje de identidad con reguladores transcripcionales y proteínas HrpG de otras especies del género *Xanthomonas*, y también de bacterias de los géneros *Ralstonia* y *Burkholderia*, entre otras. Con proteínas HrpG de bacterias del género *Xanthomonas*, como por ejemplo: *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, posee un 99 %, 98 % y 97 % de identidad, respectivamente. El apilamiento de estas proteínas con HrpG de Xac muestra que la secuencia aminoacídica en la región C-terminal de la proteína donde se encuentra la mutación está altamente conservada (figura 5.3A). Esta búsqueda bioinformática también proporcionó información acerca de la presencia de distintos dominios conservados en HrpG de Xac mediante la base de datos Conserved Domains Database (CDD) del NCBI (sección 3.18 de Materiales y Métodos).

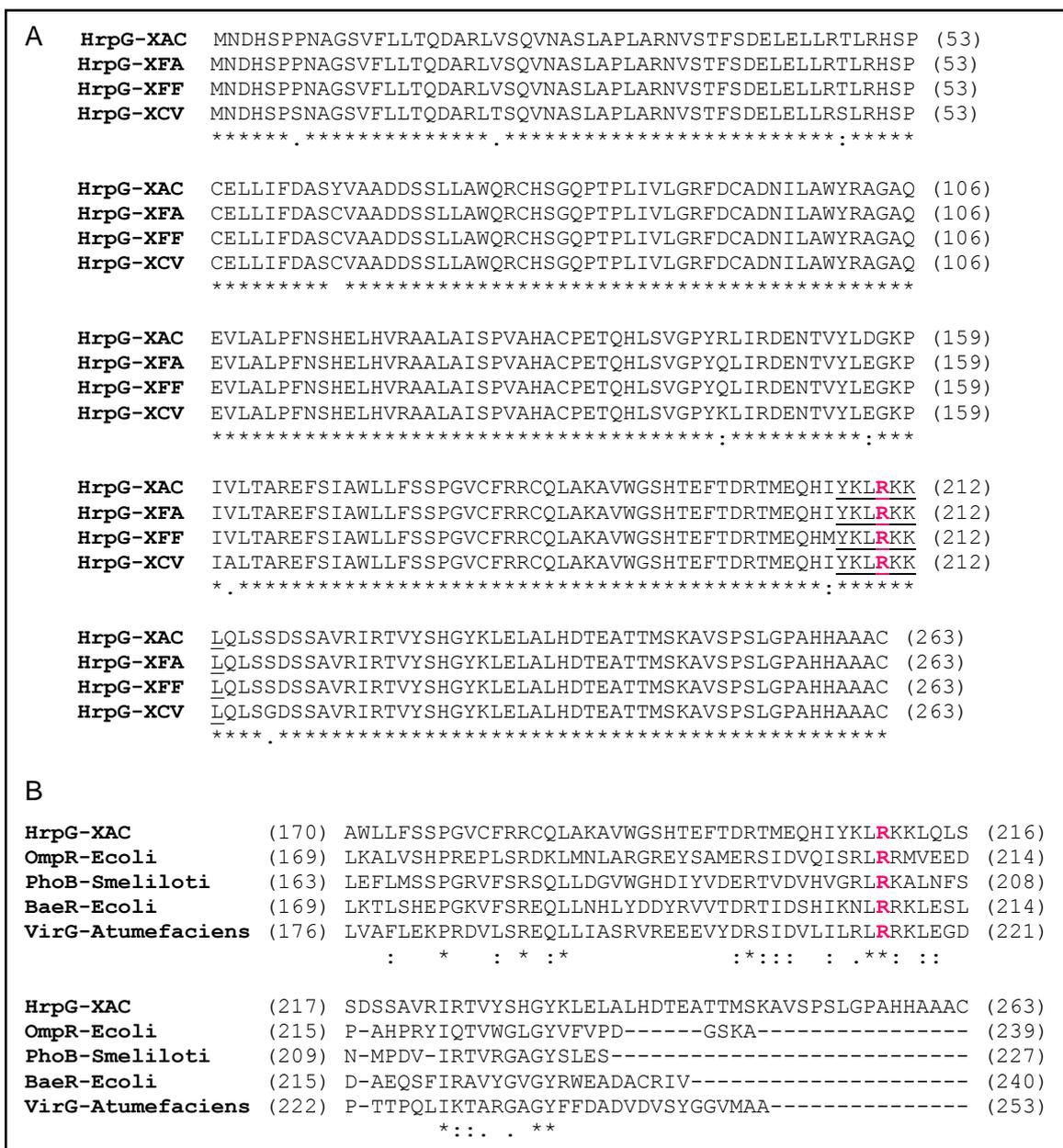


Figura 5.3. Alineamientos de secuencias entre HrpG y proteínas homólogas.

A: alineamiento de secuencias con proteínas reguladoras HrpG de diversas bacterias del género *Xanthomonas*. XAC: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xcc99-1330) secuencia de *hrpG* secuenciada e idéntica a la secuencia de la cepa 306 (da Silva y col., 2002, AAM36136.1), XFA: *Xanthomonas fuscans* subesp. *aurantifolii* cepa ICPB 11122 (ZP_06705615.1), XFF: *Xanthomonas fuscans* subesp. *fuscans* (ABW87294.1), XCV: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cepa 85-10 (YP_363045.1). B: alineamiento de secuencia de las regiones C-terminales de proteínas reguladoras de la familia OmpR. OmpR-Ecoli: OmpR de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655 (NP_417864.1), PhoB-Smeliloti: PhoB de *Sinorhizobium meliloti* 1021 (NP_384621.1), BaeR-Ecoli: BaeR de *Escherichia coli* cepa K-12 subcepa MG1655 (NP_416583.1), VriG-Atumefaciens: VirG de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 (NP_396499.1). En A y B: se resaltó en rosa el residuo de arginina conservado en HrpG de Xac donde se obtuvo la mutación puntual por un residuo de cisteína; los números entre paréntesis muestran el número de aminoácido inicial o final de la secuencia respecto de los aminoácidos totales de cada proteína. Sólo en A se subrayaron los aa que se muestran en la figura 5.2B. (*) Posición con un único aa totalmente conservado. (:) Posición con aa conservados y con propiedades altamente similares. (.) Posición con aa conservados y con propiedades débilmente similares.

HrpG pertenece a la superfamilia de reguladores transcripcionales OmpR/PhoB con dos regiones bien definidas, la región *N*-terminal con homología a dominios receptores de señal de sistemas de dos componentes bacterianos como en la proteína de quimiotaxis CheY, y la región *C*-terminal con homología a los dominios de unión a ADN del tipo hélice-giro-hélice (figura 5.2A). La mutación del aminoácido arginina en posición 210 por cisteína (R210C) se encuentra en el dominio de unión a ADN de la región *C*-terminal de HrpG. Al comparar distintos reguladores de la familia OmpR con HrpG, así como con proteínas HrpG de otras *Xanthomonas*, mediante alineamientos de secuencia con las herramientas ClustalW2 y BLAST, se observó que el residuo de arginina está altamente conservado. Por ejemplo, la arginina 210 de HrpG de *Xac* está conservada con la arginina 209 de OmpR de *E. coli* que se vio involucrada en la unión al ADN (Rhee y col., 2008) (figura 5.3B).

Esto sugiere que este residuo aminoacídico de HrpG al igual que el de sus homólogos podría estar involucrado en la unión a las regiones promotoras de los genes del cluster *hrp* y por lo tanto podría participar en la activación transcripcional del mismo, lo cual conduce a la translocación de factores de virulencia a la planta hospedadora (Rhee y col., 2008). Entonces, el fenotipo observado en los clones 7, 8, 14 y 30 (figura 5.1) se debe a la presencia de este regulador mutado y no funcional, todos los clones poseen el mismo plásmido con la misma mutación. Por el contrario, el clon 17 posteriormente se determinó mediante minipreparación que no poseía la construcción pBBR1MCS-3 con la proteína mutante R210C, por lo que el fenotipo que presentó era el de la cepa salvaje. Para continuar trabajando se eligió el clon 8, que en todas las inoculaciones ensayadas mostró el fenotipo con menor virulencia, necrosis y clorosis del tejido vegetal. Esta cepa que sobreexpresa el regulador HrpG con la mutación puntual R210C se denominó XacR210C.

A fin de obtener la secuencia salvaje de HrpG sobreexpresada en *Xac*, se volvió a amplificar por PCR la secuencia codificante de HrpG con los oligonucleótidos diseñados, y se clonó en el vector pBBR1MSC-3. Se hicieron los controles correspondientes y una vez secuenciada la nueva construcción y verificada la secuencia correcta de HrpG, se transformó la cepa *E. coli* S17-1 que se conjugó con *Xac* salvaje para obtener cepas transconjugantes sobreexpresantes de HrpG. Las cepas resistentes al antibiótico Tc se crecieron en medio líquido SB y se inocularon en hojas de naranja en una concentración de 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM.

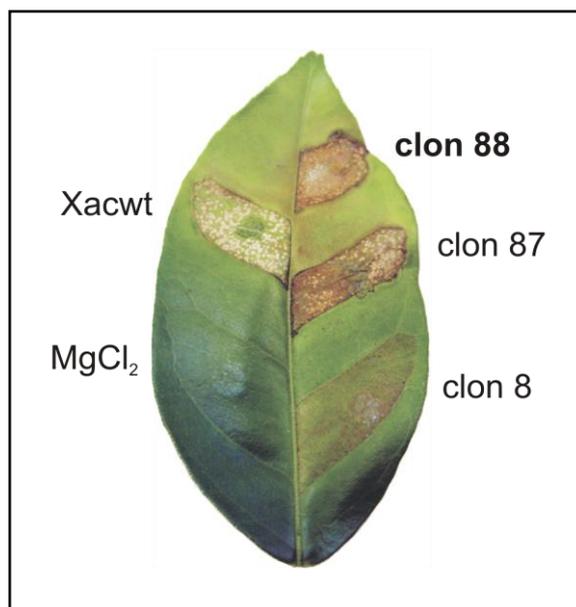


Figura 5.4. Inoculación de cepas transconjugantes de Xac conteniendo la nueva construcción pBBR1MCS-3-HrpG.

Se inocularon hojas de naranja con 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM que además se utilizó como control de infiltración. Se muestra una foto representativa de una hoja de naranja 15 días post inoculación con la cepa salvaje de Xac (Xacwt), y los clones 8, 87 y 88 de las cepas obtenidas por conjugación bacteriana.

En la figura 5.4 se muestra una hoja inoculada con algunos clones obtenidos y todos fueron capaces de producir enfermedad, a diferencia de lo que sucedió con los clones 7, 8, 14 y 30 de las cepas sobreexpresantes del regulador mutante R210C (figura 5.1). Los clones 87 y 88 (figura 5.4) mostraron un fenotipo necrótico, más agresivo que la cepa salvaje, mientras que otro de los clones (clon 8) mostró un fenotipo similar a Xac salvaje. Mediante minipreparación de estas cepas se determinó que el clon 8 no poseía la construcción pBBR1MCS-3-HrpG, por ello mostraba un fenotipo más similar a la cepa salvaje que los clones 87 y 88 que por el contrario poseían la construcción que sobreexpresa HrpG. Para continuar trabajando se eligió el clon 88, que en todas las inoculaciones ensayadas produjo un fenotipo más necrótico que la cepa salvaje. Esta cepa se denominó XacHrpG y sobreexpresa la proteína HrpG salvaje.

5.3-Construcción de una cepa mutante de *X. axonopodis* pv *citri* en el gen *hrpG*

A fin de comprender el fenotipo producido por las cepas sobreexpresantes de las proteínas HrpG y R210C y de caracterizar en profundidad el SSTT de Xac, se construyó una

cepa mutante en el gen *hrpG*. La mutante se construyó por intercambio de marcador como se detalla en la sección 3.3.5 de Materiales y Métodos. Como resultado de la conjugación bacteriana se seleccionaron varios clones en medio de cultivo selectivo y luego se verificó por PCR la ausencia del gen *hrpG*. Para esto, se usó el par de oligonucleótidos HrpGBamHIup y HrpGXholdown (tabla 3.4 de Materiales y Métodos, figura 5.5A) que amplifican un fragmento 884 pb que contiene la secuencia codificante de *hrpG*. Se realizó la reacción de PCR a partir de ADN genómico y los resultados obtenidos muestran que en la cepa salvaje se amplificó un fragmento del tamaño esperado pero no se pudo detectar en la cepa mutante XacΔ*hrpG*, lo que indica la ausencia del gen *hrpG* (figura 5.5C). Para confirmar la ausencia del gen y verificar la inserción del casete de resistencia Ω en la región genómica de *hrpG*, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 2300 pb con el oligonucleótido oligo-Sp que hibrida en el interior del casete de resistencia a Sp/Sm y el oligonucleótido 3' down HindIII que hibrida en la región 3' flanqueante de *hrpG* (figura 5.5B). Se obtuvo el producto de amplificación en la cepa mutante XacΔ*hrpG*, mientras que no se obtuvo amplificación en la cepa salvaje de Xac (figura 5.5D). Los resultados de estas reacciones de PCR confirman que la cepa XacΔ*hrpG*, no posee el gen y además contiene el casete Ω de resistencia a los antibióticos Sp/Sm insertado en la región genómica de *hrpG*.

5.4-Complementación génica de la cepa mutante XacΔ*hrpG*

Con el objeto de confirmar la mutación en XacΔ*hrpG*, se llevó a cabo su complementación génica con una copia de la secuencia codificante de HrpG. Además, se complementó la cepa mutante con un plásmido que contiene la secuencia codificante de la proteína mutante en el aminoácido 210 para comprender el rol de este aminoácido en la regulación del SSTT y el efecto que puede tener en el contexto genómico de la cepa mutante en comparación con el de la cepa sobreexpresante.

Para la complementación de la cepa mutante, la misma se conjugó con las cepas de *E. coli* S17-1 que contienen los plásmidos pBBR1MSC-3-HrpG y pBBR1MCS-3-R210C, construidas previamente para la construcción de las cepas sobreexpresantes. Las cepas complementadas se denominaron XacΔ*hrpG*Gc-HrpG y XacΔ*hrpG*Gc-R210C y se verificó la presencia de ambas secuencias codificantes mediante PCR con los oligonucleótidos HrpGBamHIup y HrpGXholdown. Se obtuvo el fragmento esperado de 884 pb en ambas

cepas complementadas y en la cepa salvaje, mientras que en la cepa mutante *XacΔhrpG* nuevamente no se observó amplificación con este par de oligonucleótidos (figura 5.5E). Estos resultados verifican una vez más la ausencia de *hrpG* en la cepa mutante y la presencia de las secuencias codificantes de HrpG y R210C en ambas cepas complementadas.

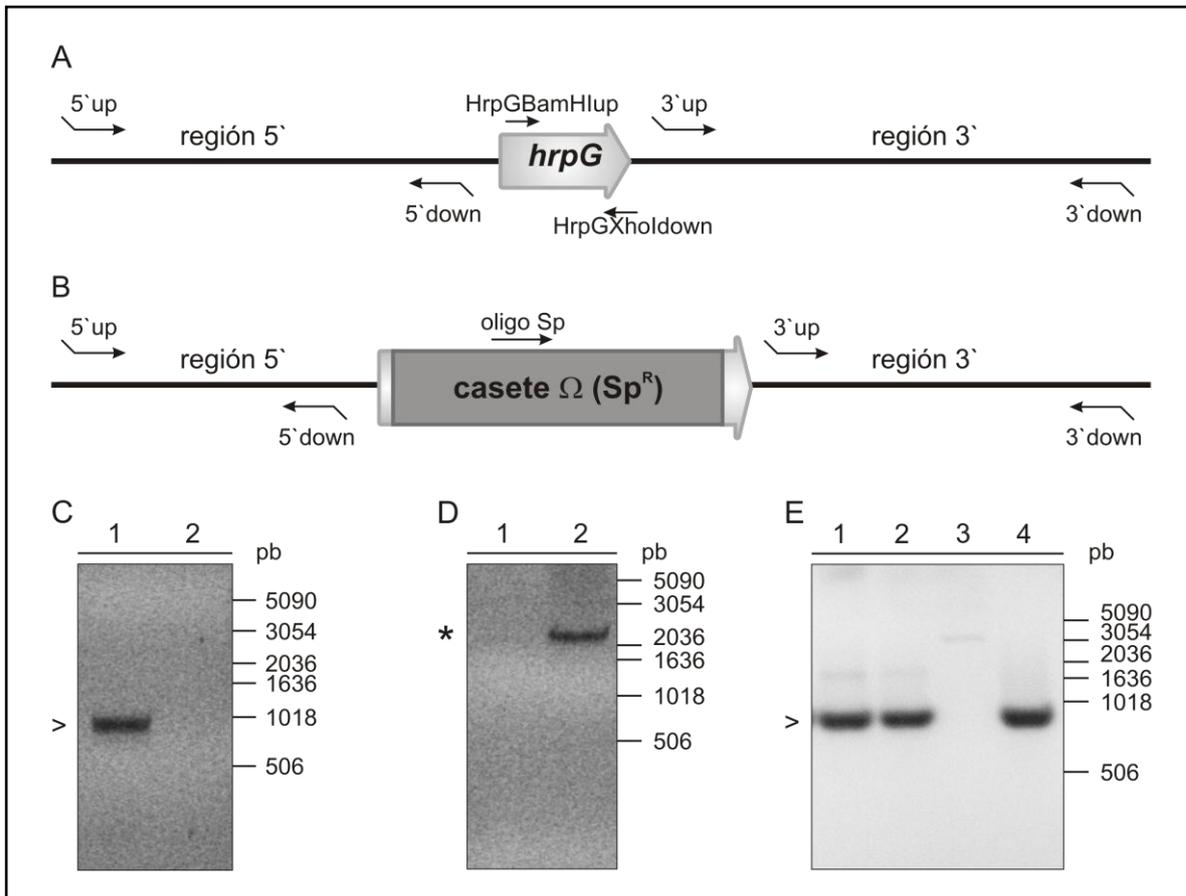


Figura 5.5. Construcción y complementación de la cepa mutante *XacΔhrpG*.

Esquema de la región genómica de *hrpG* en la cepa salvaje (A) y en la cepa mutante (B). En A y B se muestran los oligonucleótidos utilizados para construir la cepa mutante: 5'up, 5'down, 3'up y 3'down; que hibridan en las regiones 5' y 3' del gen, de 837 pb y 1070 pb de longitud, respectivamente; también se muestran los oligonucleótidos que amplifican la secuencia codificante completa de *hrpG* (HrpGBamHIup y HrpGXholdown), y el oligo-Sp que hibrida en el casete Ω de resistencia a Sp y Sm. C: gel de agarosa con los productos de PCR obtenidos con el par de oligonucleótidos HrpGBamHIup y HrpGXholdown que hibridan en el gen *hrpG*. 1: *Xac* salvaje, 2: *XacΔhrpG*, > fragmento de 884 pb correspondiente a *hrpG*. D: PCR con el par de oligonucleótidos oligo-Sp y 3'down HindIII que amplifican parte del casete de resistencia y la región 3' flanqueante del gen *hrpG*. 1: *Xac* salvaje, 2: *XacΔhrpG*, * fragmento de 2300 pb correspondiente al casete Ω y la región 3' del gen. E: Complementación de la cepa *XacΔhrpG* con la secuencia codificante de HrpG y la proteína mutante R210C. Gel de agarosa para visualizar los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos HrpGBamHIup y HrpGXholdown. Como molde de las reacciones de PCR se utilizó ADN genómico de *XacΔhrpGc-HrpG* (1), *XacΔhrpGc-R210C* (2), *XacΔhrpG* (3) y *Xac* salvaje (4). > fragmento de 884 pb correspondiente a las secuencias codificantes de HrpG y R210C. A la derecha de cada gel se muestran algunas bandas del marcador de peso molecular 1 kb. *hrpG* es de 792 pb de longitud y el casete Ω es de 2000 pb.

5.5- Caracterización de las cepas sobreexpresantes XacHrpG y XacR210C, la cepa mutante XacΔhrpG y las cepas complementadas, en la cancrrosis de los cítricos

5.5.1- Inoculación de plantas de naranja con cultivos bacterianos

Con el objetivo de analizar y caracterizar el fenotipo de las cepas de Xac construidas, se inocularon plantas hospedadoras de naranja (*Citrus sinensis*) con suspensiones bacterianas de 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM. Como control se infiltró $MgCl_2$ 10 mM. En la figura 5.6A se muestran las lesiones producidas 7 días post inoculación con la cepa salvaje de Xac y las cepas sobreexpresantes XacHrpG (clon 88) y XacR210C (clon 8). Se puede apreciar la diferencia fenotípica de las lesiones producidas entre XacHrpG, que produce lesiones cancróticas como la cepa salvaje, y XacR210C que sólo produce un leve cambio en la coloración del tejido de la zona infectada sin generar necrosis o mayor daño tisular. También se inoculó la cepa XacΔhrpB (tabla 3.1 de Materiales y Métodos), una mutante del operón *hrpB* del cluster *hrp* de Xac que codifica componentes esenciales del sistema de secreción tipo III. La falta de un sistema de secreción funcional en XacΔhrpB se confirmó previamente en el laboratorio por la ausencia de síntomas de enfermedad al ser inoculada en hojas de naranja, y de respuesta HR en hojas de diferentes plantas no hospedadoras de Xac (Dunger y col., 2005). Como se observa en la figura 5.6A la cepa XacΔhrpB no produce síntomas de cancrrosis y sólo se observó un leve oscurecimiento y humedecimiento del tejido producto de la inoculación, mientras que XacR210C si bien no se comporta como la cepa salvaje, muestra algunos puntos de necrosis y clorosis del tejido que no están presentes en la zona inoculada con XacΔhrpB. Esto sugiere que la sobreexpresión de R210C compite con la copia salvaje y funcional de *hrpG* que está presente en el genoma de XacR210C, y disminuye la patogenicidad y el desarrollo de los síntomas característicos de la cancrrosis, probablemente debido a una insuficiente expresión de los genes del cluster que permitan el correcto ensamblado del SSTT. Por el contrario en XacΔhrpB, el SSTT no es funcional porque se encuentran mutados genes esenciales para el ensamblado de la estructura del pilus Hrp. En la figura 5.6B se muestra una hoja de naranja inoculada con la cepa mutante en *hrpG* que no fue capaz de desarrollar los síntomas característicos de la enfermedad a diferencia de la cepa salvaje de Xac. Este fenotipo corrobora la ausencia del gen y por lo tanto la falta de un sistema de secreción de tipo tres funcional que le permita a la bacteria translocar factores de virulencia en el interior de las células vegetales para colonizar a la planta hospedadora.

Como era de esperar, la cepa complementada XacΔhrpGc-HrpG revirtió el fenotipo de la cepa mutante a uno similar al de la cepa salvaje (figura 5.6B). Por el contrario, la cepa complementada XacΔhrpGc-R210C no fue capaz de revertir el fenotipo de la cepa mutante (figura 5.6B). La sobreexpresante XacR210C y la cepa mutante no produjeron síntomas de cancrrosis, en el primer caso la presencia de la copia génica que codifica HrpG en la cepa XacR210C implicaría una competencia entre las proteínas que no permite el correcto funcionamiento del SSTT; por el contrario en la mutante XacΔhrpG la ausencia del regulador no permite la activación de cluster y su complementación con R210C, no revierte el fenotipo, indicando que este regulador no sería funcional.

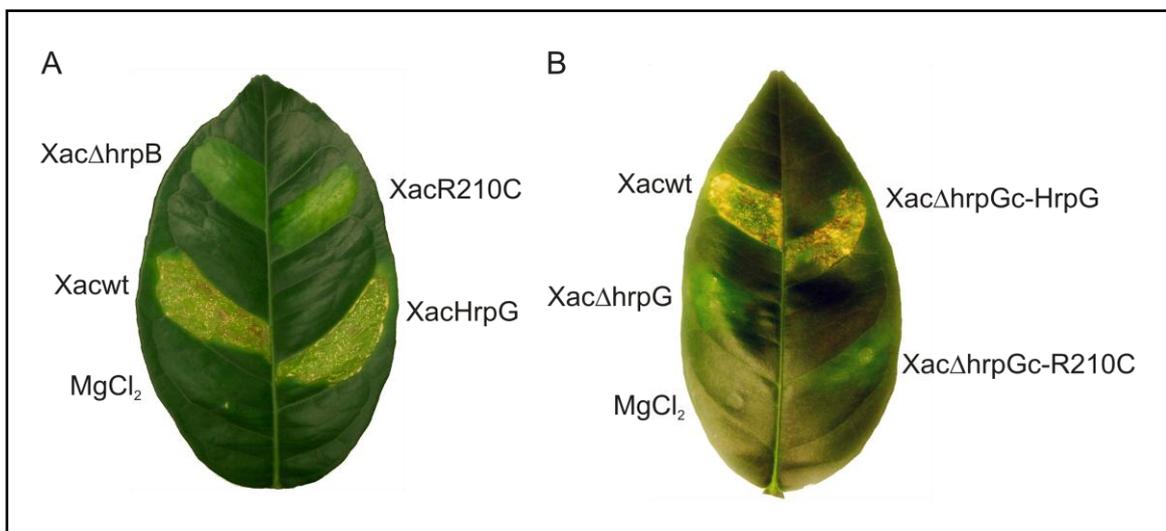


Figura 5.6. Patogenicidad en hojas de naranja de las cepas sobreexpresantes XacHrpG y XacR210C, la cepa mutante XacΔhrpG y las cepas complementadas.

A: Lesiones producidas en hoja de naranja inoculada con 10^7 UFC/ml de Xac salvaje (Xacwt), XacHrpG, XacR210C y XacΔhrpB. B: Hoja de naranja inoculada con 10^7 UFC/ml de las cepas Xac salvaje (Xacwt), XacΔhrpG y las cepas complementadas XacΔhrpGc-HrpG y XacΔhrpGc-R210C. Se muestra una hoja representativa de 8 días post inoculación. Control de infiltración: MgCl₂ 10 mM.

5.5.2-Análisis del crecimiento bacteriano *in planta*

A fin de determinar el rol de la proteína HrpG de Xac durante el desarrollo de la cancrrosis de los cítricos y comprender los fenotipos observados de las cepas construidas, se analizó el crecimiento bacteriano en hojas de naranja mediante curvas de crecimiento *in planta*. Para ello, se inocularon hojas de naranja con suspensiones bacterianas de 10^7 UFC/ml en MgCl₂ 10 mM de las cepas de interés y a distintos tiempos post inoculación se tomaron muestras del tejido vegetal para realizar los recuentos bacterianos como se detalla en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos se expresaron en log de UFC/cm²

de tejido infectado y se muestran en la figura 5.7. La cepa sobreexpresante XacHrpG mostró un crecimiento similar al de Xac salvaje alcanzando valores de $2,2 \times 10^8$ y $8,5 \times 10^8$ UFC/cm², respectivamente, a los 6 días post inoculación (figura 5.7A). Por el contrario, XacR210C mostró un crecimiento retardado con $1,8 \times 10^7$ UFC/cm² a los 6 días post inoculación. Esta diferencia en el crecimiento se mantuvo hasta los 10 días post inoculación luego de lo cual las dos cepas sobreexpresantes y la cepa salvaje alcanzaron aproximadamente los mismos valores de UFC/cm². El fenotipo producido por XacR210C en hojas de naranja podría deberse a la falta de crecimiento bacteriano en los tejidos vegetales, sin embargo la curva de crecimiento indica que la cepa es capaz de multiplicarse *in planta* a pesar de la diferencia observada con la cepa salvaje. Estos resultados sugieren que R210C no es capaz de regular positivamente la expresión de proteínas requeridas para el ensamble y funcionamiento del SSTT para lograr la máxima virulencia pero que sí permitiría el mantenimiento y crecimiento de la bacteria en la planta. En la figura 5.7B se muestra una curva de crecimiento realizada para Xac salvaje, Xac Δ hrpG y las cepas complementadas. Rápidamente, antes de los 5 días post inoculación se observa una disminución en el crecimiento bacteriano de Xac Δ hrpG y Xac Δ hrpGc-R210C con $1,3 \times 10^4$ y $7,9 \times 10^3$ UFC/cm² a los 3 días post inoculación, respectivamente; en contraste con el crecimiento bacteriano que muestran la cepa salvaje y la cepa Xac Δ hrpGc-HrpG, que alcanzan valores de $4,5 \times 10^7$ y $1,5 \times 10^7$ UFC/cm² a los 3 días post inoculación, respectivamente. A partir de allí y hasta los 15 días post inoculación el crecimiento de la cepa salvaje continúa aumentando hasta alcanzar valores de $1,6 \times 10^{10}$ UFC/cm², mientras que el crecimiento de Xac Δ hrpGc-HrpG es más lento alcanzando valores de 8×10^7 UFC/cm². Las curvas de crecimiento para la cepa mutante y la cepa complementada con R210C decaen a medida que transcurre el tiempo post inoculación, indicando ausencia de proliferación y muerte celular (figura 5.7B). El comportamiento de Xac Δ hrpG y Xac Δ hrpGc-R210C en las curvas de crecimiento, coincide con el fenotipo observado en cada caso y es consistente con la ausencia de un SSTT funcional en la cepa mutante y la incapacidad del regulador mutante R210C de revertir el fenotipo mutante.

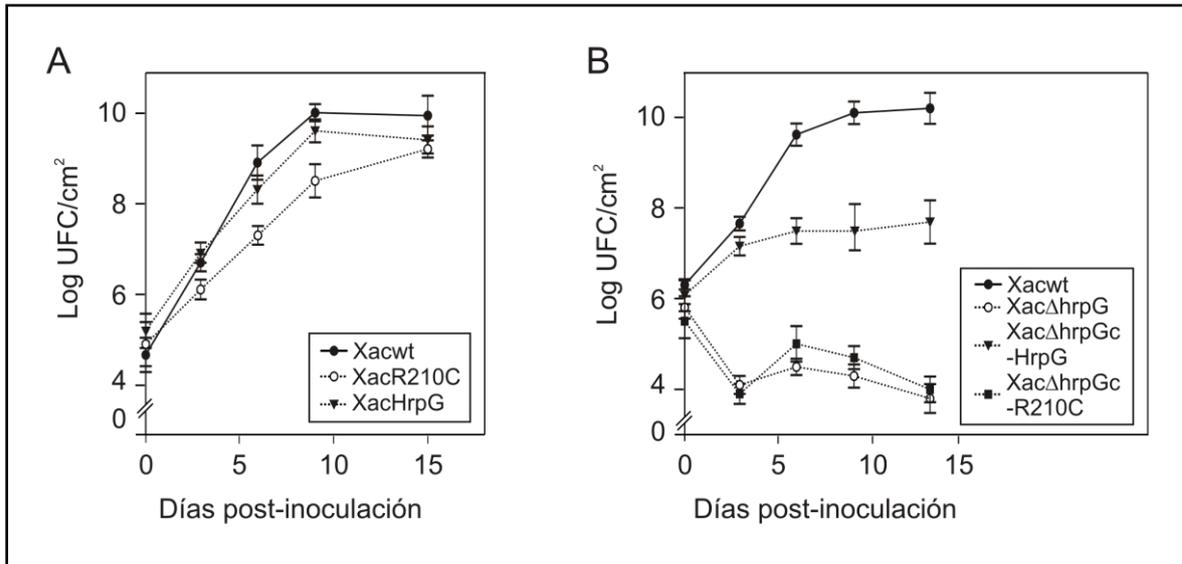


Figura 5.7. Curvas de crecimiento bacteriano en plantas de naranja.

A: Curvas de crecimiento bacteriano en hojas de naranja inoculadas con 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM de las cepas Xac salvaje (Xacwt), XacR210C y XacHrpG. B: Curva de crecimiento en hojas de naranja inoculadas con 10^7 UFC/ml de las cepas Xac salvaje (Xacwt), XacΔhrpG, XacΔhrpGc-HrpG y XacΔhrpGc-R210C. En ambos casos se muestra el crecimiento *in planta* hasta los 15 días post inoculación y los resultados se expresan como log de UFC por cm^2 de tejido infectado. Los valores representan el promedio de tres muestras por cepa, y cada experimento se repitió tres veces en plantas diferentes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA. Las barras indican los desvíos estándar.

5.6- Caracterización de las cepas de Xac construidas en la inducción de respuesta hipersensible en plantas no hospedadoras

A fin de caracterizar las cepas construidas en el desarrollo de la respuesta hipersensible (HR), se inocularon hojas de tomate con las cepas en estudio y la cepa salvaje de Xac con una concentración de 10^7 UFC/ml en $MgCl_2$ 10 mM. Como control se inoculó $MgCl_2$ 10 mM. La figura 5.8 muestra el desarrollo de la respuesta HR en hojas de tomate 24 hs post inoculación. En las zonas inoculadas con Xac salvaje y XacHrpG se observa una respuesta HR característica, lo que implica la existencia de un cluster *hrp* funcional en ambas cepas. Por el contrario, no se observó HR en las zonas inoculadas con XacR210C (figura 5.8A), XacΔhrpG y la cepa complementada XacΔhrpGc-R210C (figura 5.8B), mientras que la cepa mutante complementada con el regulador salvaje HrpG produjo respuesta HR en tomate (figura 5.8B). Estos resultados, junto con los fenotipos observados en hojas de naranja y las curvas de crecimiento confirman que la cepa mutante y la cepa complementada con R210C no poseen un SSTT funcional que permita

la correcta expresión de los genes del cluster *hrp* y el ensamblado del pilus Hrp involucrados en la virulencia y patogenicidad de *Xac*. La ausencia de un fenotipo de cancrrosis en plantas hospedadoras de naranja y de una respuesta del tipo HR en hojas de tomate es indicativo de un “fenotipo *hrp*”, que implica una alteración en el cluster *hrp*, en este caso a nivel de la proteína reguladora HrpG, que no permite la expresión y el ensamblado del SSTT capaz de translocar proteínas efectoras y distintos elicitors en los tejidos vegetales (Alfano y Collmer, 1997). Estos resultados confirman que al igual que en otras bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas* HrpG es esencial para la activación del SSTT (Wengelnik y col., 1996b). Por otro lado, la ausencia de respuesta HR en el caso de *XacR210C*, podría deberse a la baja expresión del SSTT que no es suficiente para elicitar los mecanismos de defensa de la planta que desencadenan la HR.

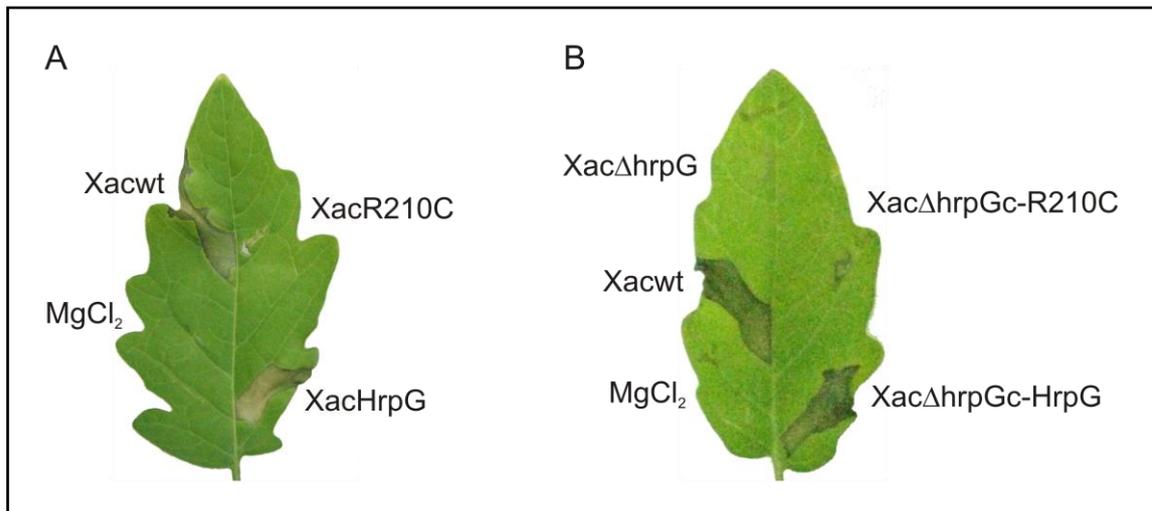


Figura 5.8. Respuesta HR en plantas no hospedadoras de tomate.

Se muestran hojas de tomate 24 hs post inoculación con la cepa salvaje de *Xac* (*Xacwt*) y las cepas sobreexpresantes *XacHrpG* y *XacR210C* (A); la cepa mutante *XacΔhrpG* y las cepas complementadas *XacΔhrpGc-HrpG* y *XacΔhrpGc-R210C* (B). Todas las cepas se inocularon a una concentración de 10^7 UFC/ml. Como control se infiltró $MgCl_2$ 10 mM.

5.7- Caracterización mediante ensayos microbiológicos de las cepas construidas de *Xac* en relación con el regulador HrpG

Diversos estudios han reportado la regulación cruzada entre las proteínas reguladoras del sistema de secreción tipo III (SSTT), HrpG y HrpX, y otros sistemas de secreción, como el sistema de secreción tipo II (SSTD) (Noël y col., 2001; Wei y col., 2007; Yamazaki y col., 2008a; Yamazaki y col., 2008b), donde se observó regulación positiva o

negativa mediada por HrpG y/o HrpX de genes que no pertenecen al cluster *hrp* y no poseen cajas PIP en sus regiones promotoras. Debido a la participación de HrpG y HrpX en la regulación de múltiples factores asociados con la virulencia; y teniendo en cuenta los fenotipos observados en la patogénesis de las cepas construidas, se realizaron distintos ensayos para caracterizar en profundidad las cepas XacHrpG, XacR210C, XacΔhrpG y las cepas complementadas. Estos ensayos se realizaron a fin de determinar el rol que cumpliría esta proteína reguladora del SSTD en diversos procesos y funciones relacionados con la colonización y multiplicación del patógeno en plantas hospedadoras.

5.7.1-Secreción de proteasas

Se estudió el comportamiento de las cepas construidas en relación con la secreción de proteasas por el SSTD, y para ello se ensayó la actividad proteasa como se detalla en la sección 3.12 de Materiales y Métodos, en medio rico SB y en medio mínimo XVM2 que es un medio mimetizador del apoplasto vegetal e inductor del SSTD y genes de virulencia. En las placas inoculadas se visualizó la actividad proteasa como halos claros alrededor de las colonias. Como se muestra en la figura 5.9A y en la tabla 5.1 no se observaron diferencias en la actividad proteasa entre las cepas Xacwt y XacR210C, sin embargo la cepa XacHrpG mostró menos actividad proteasa que Xacwt tanto en medio rico (datos no mostrados) como en el medio mínimo XVM2. El comportamiento de la cepa sobreexpresante de la proteína HrpG coincide con lo reportado para la cepa de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) que expresa constitutivamente el cluster *hrp* mediante una mutación puntual en la secuencia de HrpG y que también disminuye su actividad proteasa extracelular en placas suplementadas con leche, en comparación con la cepa salvaje de Xcv (Noël y col., 2001). En el caso de la cepa mutante y las cepas complementadas con las proteínas HrpG y R210C no se observaron diferencias significativas en la producción de proteasas extracelulares en comparación con la cepa salvaje de Xac en medio de cultivo rico SB (datos no mostrados). Sin embargo, en medio XVM2 se observó que la cepa mutante complementada con la proteína HrpG produjo halos de degradación de menor longitud que las otras cepas, mostrando un comportamiento similar al de la cepa sobreexpresante XacHrpG (figura 5.9A y tabla 5.1).

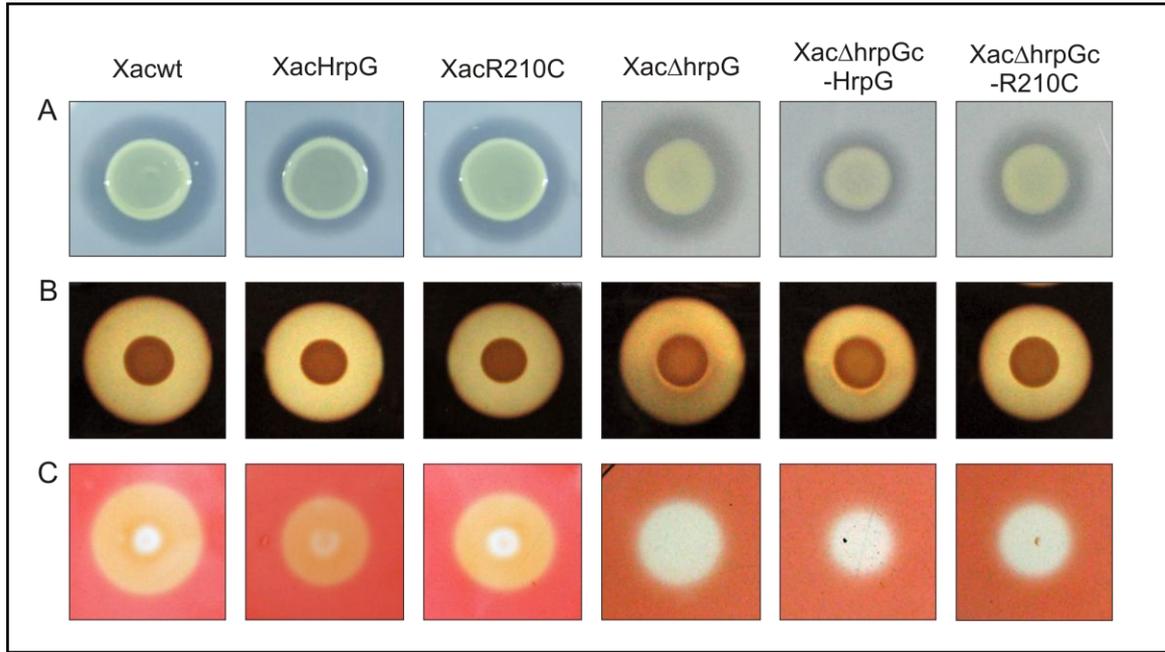


Figura 5.9. Ensayos de actividad proteasa, amilasa y celulasa.

Placas de XVM2-agar suplementadas con 0,5 % de leche para determinar actividad proteasa (A), 0,2 % de almidón para la actividad amilasa (B) y 0,1 % de carboximetilcelulosa para ensayar la actividad celulasa (C). Las placas se inocularon con la cepa salvaje de Xac (Xacwt), las cepas sobreexpresantes XacHrpG y XacR210C, la cepa mutante XacΔhrpG y las cepas complementadas XacΔhrpGc-HrpG y XacΔhrpGc-R210C. Para visualizar los halos de degradación enzimática, las placas de almidón se tiñeron con lugol y las placas con carboximetilcelulosa se tiñeron con rojo congo. Los valores de los halos producidos por las cepas en cada ensayo se detallan en la tabla 5.1. En cada cuadro se muestra la colonia bacteriana y el halo a su alrededor de actividad proteasa, amilasa y celulasa, respectivamente.

Tabla 5.1. Medidas de los halos de actividad proteasa, amilasa y celulasa en medio XVM2.

Cepa	Proteasa (cm)	Amilasa (cm)	Celulasa (cm)
Xacwt	0,55 ± 0,06	0,30 ± 0,02	0,83 ± 0,18
XacHrpG	0,38 ± 0,15*	0,27 ± 0,02	0,73 ± 0,12
XacR210C	0,51 ± 0,16	0,25 ± 0,03	0,73 ± 0,06
XacΔhrpG	0,54 ± 0,08	0,30 ± 0,03	0,88 ± 0,11
XacΔhrpGc-HrpG	0,37 ± 0,05*	0,35 ± 0,07	0,73 ± 0,04
XacΔhrpGc-R210C	0,50 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,68 ± 0,11

Valores promedio (en cm) de los halos de actividad enzimática y los respectivos desvíos estándar producidos en placas de XVM2 suplementadas con 0,5 % leche (actividad proteasa), 0,2 % almidón (actividad amilasa) y 0,1 % carboximetilcelulosa (actividad celulasa), producidos por Xac salvaje (Xacwt), las cepas sobreexpresantes XacHrpG y XacR210C, la cepa mutante XacΔhrpG, y las cepas complementadas XacΔhrpGc-HrpG y XacΔhrpGc-R210C. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y cada uno se hizo por duplicado, los datos se analizaron mediante ANOVA. Con el * se indican las cepas que mostraron una diferencia significativa respecto de la cepa salvaje, con un nivel de significancia del 96,54 % para XacHrpG y 99,62 % para XacΔhrpGc-HrpG.

5.7.2-Secreción de amilasas

Además de la secreción de proteasas, algunos reportes indican que HrpG y HrpX controlarían negativamente a nivel transcripcional, la síntesis y secreción de α -amilasa, una enzima extracelular secretada por el SSTD (Yamazaki y col., 2008b). En este contexto, se determinó el comportamiento de las cepas construidas en placas de SB y XVM2 suplementadas con 0,2 % de almidón (sección 3.12 de Materiales y Métodos). Las placas inoculadas se revelaron con el reactivo lugol, la actividad α -amilasa se detectó por los halos claros alrededor de las colonias y se midió la longitud de los halos. No se observaron diferencias significativas en la actividad amilasa entre la cepa salvaje de Xac (Xacwt), las cepas sobreexpresantes XacR210C y XacHrpG, la cepa mutante y las complementadas, tanto en medio rico (datos no mostrados) como en el medio mínimo XVM2 (figura 5.9B, tabla 5.1). Estos resultados sugieren que en Xac la proteína HrpG no estaría involucrada en la secreción de amilasas extracelulares.

5.7.3-Secreción de celulasas

Las celulasas son exoenzimas producidas por patógenos de plantas y son muy importantes para la degradación de la pared celular vegetal compuesta principalmente por celulosa. La secreción de estas enzimas favorece la ruptura de la pared celular y el acceso del patógeno directamente a la membrana plasmática vegetal donde puede, a través del SSTT, translocar moléculas efectoras directamente en el interior de la célula vegetal para desencadenar la infección. A fin de continuar caracterizando las cepas en estudio se analizó la secreción de estas exoenzimas. Para esto se prepararon placas de medio rico y mínimo suplementadas con 0,1 % de carboximetilcelulosa, un polímero de alto peso molecular que mimetiza la celulosa pero no es transportada al interior de las células (Kim y col., 2000). Luego de ser inoculadas con las cepas e incubadas a 28 °C, las placas se revelaron mediante tinción con una solución de rojo congo (sección 3.12 de Materiales y Métodos). La actividad carboximetilcelulasa se visualizó como halos claros alrededor de las colonias en contraste con el color rojo del colorante y se midió la longitud de los halos. Como se puede ver en la figura 5.9C, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad celulasa entre las cepas analizadas, en medio rico (datos no mostrados) y en XVM2 (tabla 5.1). Mediante estos experimentos no se puede atribuir un rol para HrpG como regulador de la producción o secreción de estas exoenzimas en Xac.

5.8-Estudio de la movilidad bacteriana en las cepas construidas de Xac

Debido a la similitud estructural entre el SSTT y el aparato de secreción flagelar de tipo III; y dado que el flagelo participa en la movilidad bacteriana que facilita la colonización de plantas hospedadoras, se realizaron ensayos de movilidad de tipo swimming y swarming para caracterizar las cepas construidas. A partir de cultivos bacterianos en fase exponencial de crecimiento, se inocularon placas de swimming (SB 0,3 % agar) y de swarming (SB 0,7 % agar), y las placas se incubaron durante 48 hs a 28 °C. Transcurrido ese tiempo se determinó el diámetro de las colonias obtenidas para cada cepa pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Xacwt, XacHrpG y XacR210C (figura 5.10), Xac Δ hrpG, Xac Δ hrpGc-HrpG y Xac Δ hrpGc-R210C (datos no mostrados). En la tabla 5.2 se muestran los valores promedios y los desvíos estándar obtenidos de cada experimento realizado por triplicado. Los resultados indicarían que HrpG no produce alteraciones en ambos tipos de movilidad bacteriana mediada por el flagelo.

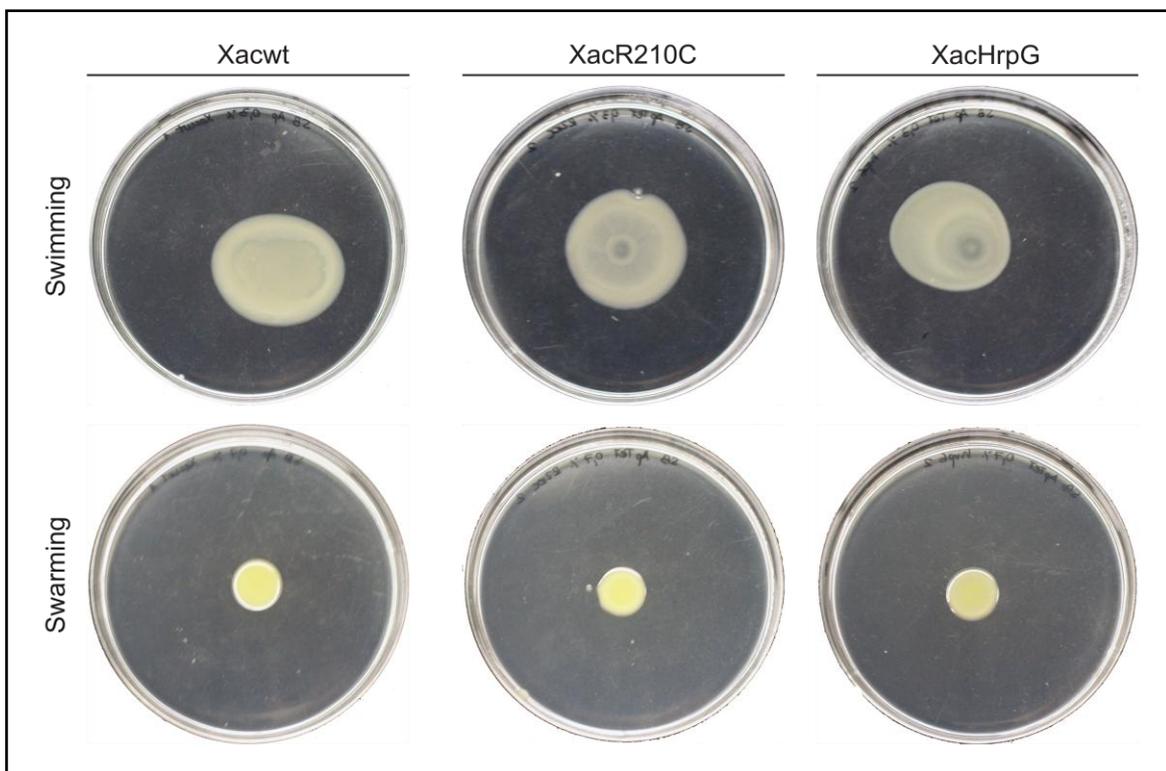


Figura 5.10. Movilidad bacteriana de tipo swimming y swarming.

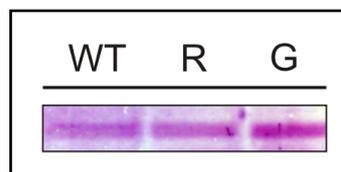
Se muestran fotos representativas de placas de swimming (SB 0,3 % agar) y placas de swarming (SB 0,7 % agar) para las cepas Xac salvaje (Xacwt), y las cepas sobreexpresantes XacR210C y XacHrpG. Los valores promedios de los diámetros de las colonias se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Diámetro de las colonias en placas de swimming y swarming.

Cepa	Swimming (cm)	Swarming (cm)
Xacwt	3,80 ± 0,92	1,29 ± 0,31
XacHrpG	3,20 ± 0,52	1,22 ± 0,36
XacR210C	3,30 ± 0,63	1,23 ± 0,28
XacΔhrpG	3,00 ± 0,56	1,60 ± 0,40
XacΔhrpGc-HrpG	2,20 ± 0,14	1,70 ± 0,51
XacΔhrpGc-R210C	2,15 ± 0,49	1,50 ± 0,38

Valores del promedio (en cm) y desvío estándar obtenidos para las cepas Xacwt, XacR210C y XacHrpG, la cepa mutante XacΔhrpG, y las complementadas XacΔhrpGc-HrpG y XacΔhrpGc-R210C, en placas de swimming y swarming. Los experimentos se hicieron por triplicado. El análisis estadístico de los datos mediante ANOVA no muestra diferencias significativas en el diámetro de las colonias de las cepas ensayadas.

Para confirmar el resultado obtenido respecto de la movilidad bacteriana, se prepararon extractos proteicos totales a partir de cultivos crecidos en agitación en medio líquido SB que se separaron en función de su peso molecular en geles de poliacrilamida desnaturalizantes como se detalla en la sección 3.14 de Materiales y Métodos. Luego de la corrida electroforética el gel se tiñó para visualizar las proteínas totales (datos no mostrados) y también se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un western-blot con anticuerpo primario anti-flagelina (Castelli y col., 2008). El western-blot de la figura 5.11 no muestra diferencias significativas en las cantidades de la proteína flagelina de aproximadamente 40 kDa presente en extractos proteicos de las cepas Xacwt, XacHrpG y XacR210C. Este resultado justifica la ausencia de diferencias en la movilidad mediada por el flagelo bacteriano observada en los ensayos en placa de Petri.

**Figura 5.11.** Expresión y detección de la proteína flagelina en extractos proteicos totales.

Western-blot anti-flagelina revelado con NBT y BCIP, se muestra la banda correspondiente a la proteína Flc de Xac de 40 kDa. Se sembraron 40 μ l de extracto proteico total para cada muestra. WT: Xacwt, R: XacR210C, G: XacHrpG.

5.9-Análisis de la expresión génica en las cepas construidas de Xac

5.9.1-Expresión génica en medio de cultivo rico y en medio mínimo XVM2

La proteína HrpG es un regulador transcripcional que induce y reprime la expresión de distintos genes relacionados con el cluster *hrp*, así como también genes no relacionados con el cluster. Por ello, se analizó la expresión génica de las cepas sobreexpresantes XacHrpG y XacR210C, la cepa mutante Xac Δ hrpG y las cepas complementadas, a fin de comprender los comportamientos observados *in planta* y analizar el efecto de la sobreexpresión de HrpG o R210C y la ausencia total del regulador en el caso de la cepa mutante, sobre el nivel de expresión de ciertos genes seleccionados. Para esto, se crecieron cultivos de las cepas en estudio en medio líquido SB y XVM2 para extraer ARN y obtener moléculas de ADNc mediante retrotranscripción que se utilizaron como molde en las reacciones de PCR para amplificar distintos genes de interés (sección 3.15 de Materiales y Métodos). Como control constitutivo, se amplificó un fragmento de 217 pb del ARNr 16S con oligonucleótidos específicos (la secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de interés se detalla en la tabla 3.4 de Materiales y Métodos). Para analizar la expresión transcripcional en estas cepas se amplificaron los genes *hrpX*, *hrcC*, *hrpE* y *hrpB2*, todos pertenecientes al cluster *hrp*, algunos con funciones regulatorias y otros que codifican componentes estructurales del aparato de secreción tipo tres. El gen *hrpX* codifica la proteína regulatoria HrpX de la familia de activadores transcripcionales del tipo AraC que luego de la activación transcripcional mediada por HrpG se expresa para activar el resto del cluster *hrp* mediante el reconocimiento de las secuencias promotoras, en general de la caja PIP, presente en la mayoría de los operones y genes del cluster. *hrcC* es un gen, dentro del operón *hrpA*, que codifica una proteína secretina que se localiza en la membrana externa bacteriana formando un complejo anular. En Xcv se ha visto inducida su expresión por HrpG de manera independiente de HrpX (Wengelnik y col., 1996a). El gen *hrpE* codifica para una proteína formadora del pilus Hrp, que a diferencia de otros genes del cluster se vio expresada a un nivel basal en Xcv crecida en medio de cultivo rico, sin embargo su expresión se vio aumentada hasta 20 veces luego del crecimiento *in planta* y en medio XVM2 (Wengelnik y Bonas, 1996). El gen *hrpB2* codifica una proteína que es parte de la maquinaria de secreción (ver sección 1.6 de Introducción).

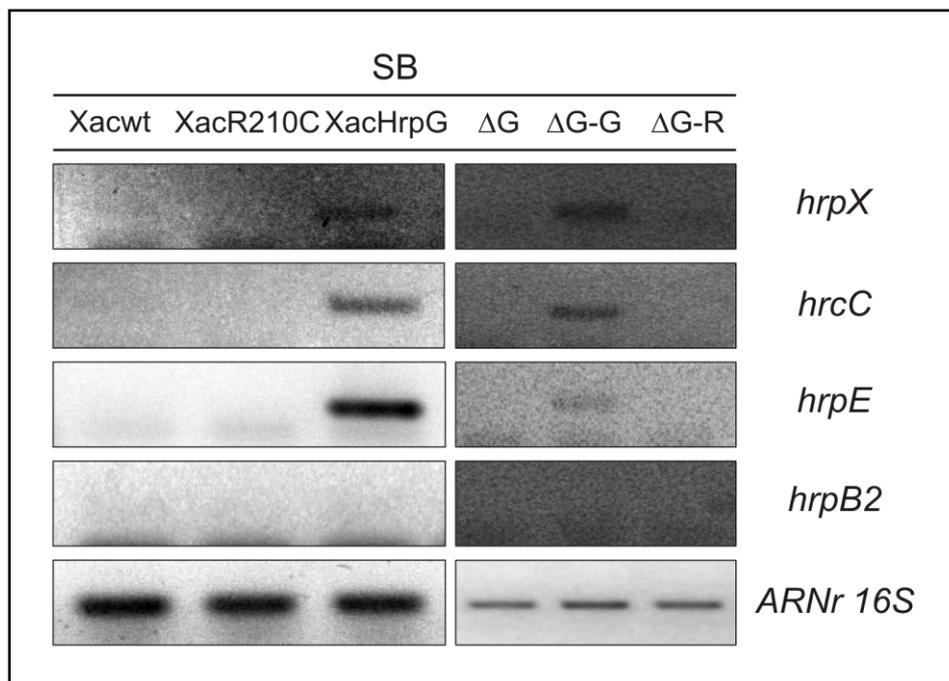


Figura 5.12. Análisis de expresión génica por RT-PCR en medio de cultivo rico.

Se amplificaron los genes *hrpX*, *hrcC*, *hrpE*, *hrpB2* y como control constitutivo el gen *ARNr 16S*, en medio SB. Se preparó ARN total de *Xac* salvaje (*Xacwt*), las cepas sobreexpresantes *XacR210C* y *XacHrpG*, la cepa mutante *XacΔhrpG* (ΔG) y las cepas complementadas *XacΔhrpGc-HrpG* ($\Delta G-G$) y *XacΔhrpGc-R210C* ($\Delta G-R$). *hrpX*: 206 pb; *hrcC*: 214 pb; *hrpE*: 302 pb; *hrpB2*: 332 pb; *ARNr 16S*: 217 pb.

En medio rico SB no se detectaron transcritos de los genes analizados en la cepa salvaje de *Xac*, confirmando que este medio no induce la expresión del cluster *hrp* (figura 5.12). En *XacR210C* tampoco se detectaron transcritos, sugiriendo que el regulador mutante R210C no sería funcional. La ausencia de transcritos en *XacΔhrpG* y *XacΔhrpGc-R210C*, confirma que la mutante no posee el regulador HrpG capaz de inducir los genes analizados y que la complementación con la proteína mutante no tiene efectos en la transcripción génica. Por el contrario en *XacHrpG* y *XacΔhrpGc-HrpG* se detectaron transcritos de todos los genes analizados, a excepción de *hrpB2*, sugiriendo que la sobreexpresión constitutiva de HrpG y la complementación de la cepa mutante con el regulador salvaje inducen la expresión de genes relacionados con el cluster *hrp* aún en condiciones no inductoras como lo es el medio rico SB (figura 5.12).

En medio mínimo XVM2, que es un medio inductor del SSTT, se observó inducción en la expresión de los genes *hrpX*, *hrcC* y *hrpE* en la cepa salvaje (figura 5.13), mostrando la capacidad de este medio mínimo de inducir la expresión de genes relacionados con el cluster *hrp*. En *XacR210C* se observó una leve inducción de *hrpX* y *hrpE* (figura 5.13),

sugiriendo que la copia salvaje de HrpG presente en esta cepa percibe señales inductoras del medio XVM2 para inducir la expresión de estos genes, aunque los niveles de transcritos no sean suficientes para el correcto funcionamiento del SSTT y el desarrollo de los síntomas de cancrrosis o HR en plantas hospedadoras y no hospedadoras. En la cepa mutante *XacΔhrpG* y en *XacΔhrpGc-R210C* no se pudo detectar amplificación de los genes específicos analizados en XVM2 al igual que en SB (figura 5.13), sugiriendo que *XacΔhrpG* no posee la proteína reguladora del SSTT HrpG, por lo cual es incapaz de activar la transcripción del cluster, incluso en medios inductores como el XVM2. En las cepas *XacHrpG* y *XacΔhrpGc-HrpG*, se observó una marcada inducción génica de los 4 genes analizados en relación con la expresión en SB (figura 5.13).

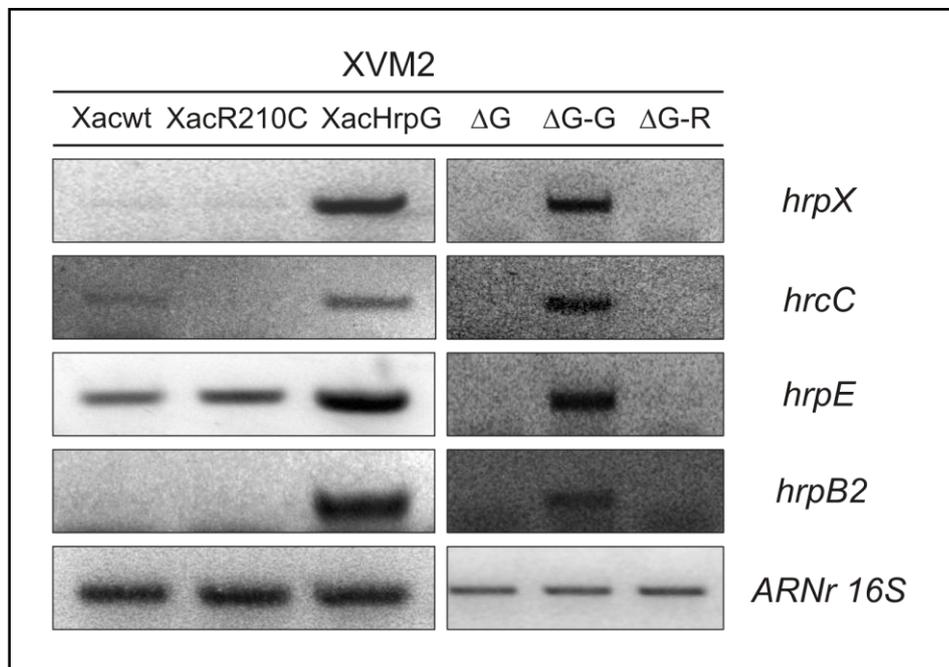


Figura 5.13. Análisis de expresión génica por RT-PCR en medio de cultivo mínimo.

Se amplificaron los genes *hrpX*, *hrcC*, *hrpE*, *hrpB2* y como control constitutivo el gen *ARNr 16S*, en medio XVM2. Se preparó ARN total de *Xac* salvaje (*Xacwt*), las cepas sobreexpresantes *XacR210C* y *XacHrpG*, *XacΔhrpG* (ΔG) y las cepas complementadas *XacΔhrpGc-HrpG* ($\Delta G-G$) y *XacΔhrpGc-R210C* ($\Delta G-R$). *hrpX*: 206 pb; *hrcC*: 214 pb; *hrpE*: 302 pb; *hrpB2*: 332 pb; *ARNr 16S*: 217 pb.

5.9.2-Expresión génica *in planta* de *XacHrpG* y *XacR210C*

La expresión de los genes en medio XVM2, que mimetiza las condiciones del apoplasto vegetal, sugiere que se expresarían durante la interacción planta-patógeno. A fin de confirmar esta hipótesis, se realizaron ensayos de RT-PCR con ARN bacteriano extraído de tejido vegetal infectado con las cepas sobreexpresantes *XacHrpG* y *XacR210C*. Para esto, se infiltraron hojas de naranja con cultivos bacterianos y se tomaron muestras

luego de 2, 3 y 6 días post inoculación (dpi), que se procesaron como se detalla en la sección 3.15 de Materiales y Métodos para extraer ARN bacteriano y obtener ADNc para realizar reacciones de PCR específicas. El gen del ARNr 16S se amplificó como control de expresión constitutiva y de los genes del cluster *hrp* se amplificó el gen *hrpE*. Los resultados muestran que *in planta* en la cepa salvaje, el gen *hrpE* se induce a partir de los 3 dpi y se mantienen los niveles hasta los 6 dpi (figura 5.14), indicando que durante la infección Xac es capaz de percibir señales propias o de la planta hospedadora, que inducen la expresión de genes *hrp* para el ensamblado del SSTT y la translocación de moléculas efectoras que permiten la colonización de la planta y el desarrollo de la enfermedad. En XacHrpG, la expresión de *hrpE* se observó antes que en la cepa salvaje (a los 2 dpi) y los niveles alcanzados siempre fueron mayores en XacHrpG que en la cepa salvaje (figura 5.14). En XacR210C se pudo observar una leve inducción de *hrpE* a los 6 dpi y los niveles alcanzados son menores que en la cepa salvaje; esto concuerda con la menor virulencia observada para esta cepa en plantas de naranja y sugiere que la copia salvaje de HrpG en el genoma es funcional, permitiendo la supervivencia de esta cepa en los tejidos vegetales a pesar de la presencia del regulador mutante R210C.

En general los resultados de los experimentos de RT-PCR evidencian que HrpG es esencial para la activación transcripcional de los genes *hrp*. Por el contrario, los resultados muestran que el regulador mutante R210C no es funcional y no es capaz de incrementar la expresión de genes del cluster *hrp* durante la infección que permitan el ensamblado del SSTT y la translocación de proteínas efectoras en la célula vegetal hospedadora.

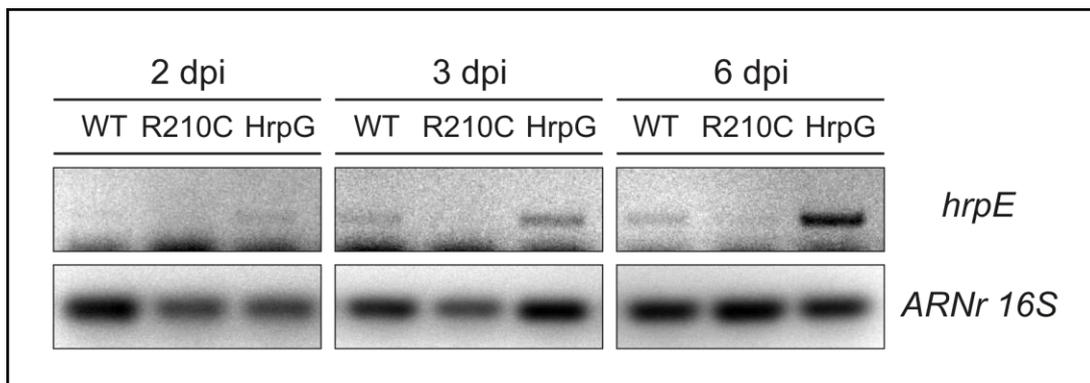


Figura 5.14. Análisis de expresión génica por RT-PCR *in planta*.

Se amplificaron los genes *ARNr 16S* como control constitutivo y el gen *hrpE* en las cepas Xacwt (WT), XacR210C (R210C) y XacHrpG (HrpG) obtenidas de plantas de naranja infiltradas con cultivos bacterianos. Las muestras se procesaron y analizaron a los 2, 3 y 6 días post inoculación (dpi). *hrpE*: 302 pb; *ARNr 16S*: 217 pb.

5.10-Discusión

El SSTT es esencial en la patogenicidad de Xac y otras bacterias fitopatógenas ya que permite la translocación de proteínas efectoras y otros elicitors directamente en el interior de las células vegetales para interferir con los mecanismos de defensa de la planta, colonizar el tejido y multiplicarse, desencadenando así los síntomas de enfermedad. HrpG es una proteína reguladora presente en Xac y otras Xanthomonas, que es esencial para la regulación del cluster *hrp* que codifica el SSTT (Wengelnik y col., 1996b). A fin de estudiar en profundidad la regulación del cluster y el rol de esta proteína en Xac, en principio se construyeron dos cepas denominadas XacHrpG y XacR210C, que contienen un plásmido replicativo y sobreexpresan la proteína HrpG y la proteína mutante R210C, respectivamente. El regulador mutante se obtuvo mediante una mutación espontánea, específicamente una transición de bases pirimídicas, producida por un error de la ADN polimerasa que se utilizó en la amplificación de la secuencia codificante de HrpG a partir de ADN genómico de Xac. Como se muestra en la figura 5.2 la mutación puntual de la secuencia nucleotídica implica una sustitución de arginina por cisteína en el codón 210. Esta mutación se encuentra en el dominio C-terminal de la proteína que posee homología a dominios de unión al ADN del tipo hélice-giro-hélice, perteneciente a la familia OmpR de reguladores transcripcionales. La inoculación de estas cepas en plantas hospedadoras de *Citrus sinensis* produjo lesiones típicas de cancrrosis en el caso de XacHrpG, mientras que XacR210C produjo sólo una clorosis sin aparición de cancros ni síntomas severos de enfermedad en relación con la cepa salvaje de Xac y mostró un menor crecimiento *in planta* en los primeros días post inoculación. En plantas no hospedadoras, XacHrpG produjo respuesta HR típica mientras que XacR210C no causó HR. En XacR210C, existe una copia normal de *hrpG* en el genoma, y la copia del regulador mutante R210C está codificada en el plásmido replicativo introducido en la bacteria, por lo tanto estos resultados sugieren que existiría una competencia entre ambas proteínas, y la expresión de HrpG no es suficiente para contrarrestar los efectos de R210C. Esta hipótesis está avalada por la falta de complementación de la cepa mutante en *hrpG* con R210C. Los resultados sugieren que la mutación en R210C es del tipo dominante negativa, donde el producto del gen mutante interfiere y predomina sobre la función del producto del gen normal. En Xcv se reportaron mutaciones puntuales en HrpG, obtenidas por mutagénesis al azar con el objetivo de lograr la expresión constitutiva de todos los genes

hrp en medio rico (Wengelnik y col., 1999). De las mutaciones reportadas en dicho trabajo, 9 consisten en una transición de guanina (G) a adenina (A) en la posición 130 de la secuencia codificante de *hrpG*, que implica un cambio de ácido glutámico (E) por lisina (K) en el aminoácido 44 (E44K); otra mutación identificada consiste en la transición G-A en el nucleótido 595 que implica la mutación D199N; y finalmente se encontró una transición A-G en la posición 581 que resultó en la sustitución H194R (Wengelnik y col., 1999). Los tres tipos de mutaciones tuvieron efectos idénticos en la actividad de los promotores dependientes de *hrpG*, activando su transcripción en medio de cultivo rico y mínimo (Wengelnik y col., 1999), además de que en todos los casos la inoculación en plantas hospedadoras produjo síntomas de enfermedad igual o más severos que la cepa salvaje, al igual que lo observado con XacHrpG. Muy pocas mutaciones en los activadores transcripcionales de la familia OmpR hacen que la proteína sea constitutivamente activa, y en general estas mutaciones se encuentran en el extremo *N*-terminal de la proteína. Por ejemplo, la sustitución D55E en OmpR de *E. coli* activa la proteína en ausencia de la quinasa sensora EnvZ (Lan e Igo, 1998); y la sustitución N54D en VirG de *A. tumefaciens* resulta en la expresión constitutiva de los genes *vir* en ausencia de inductor (Pazour y col., 1992). Por el contrario, las mutaciones en el extremo *C*-terminal de estas proteínas en general conducen a una pérdida de función, por ejemplo las mutaciones E193K, A196V y E198K de OmpR (Russo y col., 1993; Pratt y Silhavy, 1994) y V190M, D192G y D192N en PhoB de *E. coli* (Makino y col., 1996; Wengelnik y col., 1999), no permiten la activación transcripcional de los genes que regulan. Las mutaciones en el extremo *C*-terminal de HrpG de Xcv coinciden con una región entre los aminoácidos 192 a 199 de OmpR de *E. coli* que forman un bucle expuesto en la superficie de la proteína que controlaría la actividad de la ARN polimerasa mediante una interacción directa con su subunidad α (Martínez-Hackert y Stock, 1997b), esto sugiere que las sustituciones H194R y D199N en HrpG de Xcv conducirían a una activación transcripcional por la alteración del contacto con la ARN polimerasa (Wengelnik y col., 1999). Sin embargo, la mutación R210C obtenida en HrpG de Xac se encuentra en una zona de la proteína que coincide con una región de OmpR de *E. coli* definida por ciertos aminoácidos como Val²⁰³, Arg²⁰⁷ y Arg²⁰⁹ (esta última homóloga a la Arg²¹⁰ de HrpG de Xac, figura 5.3B), que determinan una superficie que tiene contacto directo con las bases y el esqueleto fosfatídico del ADN de las regiones promotoras de los genes que regula (Martínez-Hackert y Stock, 1997b; Rhee y col., 2008). La mutación R210C sería el primer ejemplo de una mutación puntual con pérdida de función en HrpG

de *Xanthomonas*, y puede contribuir a la caracterización de la proteína y su rol regulatorio.

A fin de profundizar el estudio de HrpG se construyó la cepa *Xac*ΔhrpG por intercambio de marcador y se verificó que la ausencia del gen no induce síntomas de cancrrosis en plantas hospedadoras ni respuesta HR en plantas no hospedadoras. Para revertir el fenotipo se complementó la cepa mutante con la proteína HrpG que a diferencia de *Xac*ΔhrpG produjo lesiones de cancrrosis y pudo replicarse y crecer *in planta* durante la infección. Por el contrario, la complementación con el regulador mutante R210C no fue capaz de revertir el fenotipo ni de mantener el crecimiento *in planta*, comportándose de igual manera que la cepa mutante. En 2011, se reportó la construcción de una mutante insercional de *Xac* en el gen *hrpG* que también mostró pérdida de la patogenicidad y ausencia de síntomas de enfermedad en plantas de pomelo, mientras que la complementación plasmídica con la secuencia codificante del gen revirtió el fenotipo y la patogenicidad (Guo y col., 2011). Estos resultados muestran que al igual que en *Xcv* (Wengelnik y col., 1996b) y otras *Xanthomonas*, HrpG de *Xac* es esencial para la activación del cluster *hrp* y el SSTT.

La información aportada en los últimos años por la secuenciación de varios genomas del género como el de *X. axonopodis* pv. *citri* (da Silva y col., 2002), 3 cepas de *X. campestris* pv. *campestris* (da Silva y col., 2002; Qian y col., 2005; Vorhölter y col., 2008), *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Thieme y col., 2005), 3 cepas de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ochiai y col., 2005; Lee y col., 2005b; Salzberg y col., 2008) y *X. fuscans* pv. *aurantifoli* (Moreira y col., 2010b), entre otras, permitió la publicación de varios trabajos donde mediante microarreglos o análisis bioinformáticos, se trata de englobar resultados obtenidos en las últimas décadas para entender los mecanismos generales de virulencia y patogenicidad utilizados por las bacterias del género *Xanthomonas* para colonizar a sus respectivas plantas hospedadoras (Tang y col., 2006; Qian y col., 2008b; Büttner y Bonas, 2010; Guo y col., 2011). La infección exitosa de estos patógenos depende de sistemas de secreción que liberen proteínas al medio extracelular o las transporten directamente al citosol de la célula hospedadora (Büttner y Bonas, 2010). Además de las proteínas efectoras secretadas por el SSTT, algunos patógenos utilizan una combinación de distintos sistemas de secreción para asegurar una multiplicación bacteriana eficiente y la progresión de la enfermedad (Preston y col., 2005). Teniendo en cuenta estos reportes, los ensayos microbiológicos en placa realizados con las cepas sobreexpresantes, la cepa mutante y las

cepas complementadas construidas en relación al regulador HrpG de Xac, se realizaron a fin de caracterizar fenotípicamente las cepas y con el objetivo de identificar una relación entre el SSTT y el regulador transcripcional HrpG con otros sistemas de secreción y factores de virulencia. En los experimentos realizados se observó una regulación negativa mediada por HrpG de la secreción de proteasas extracelulares. Las cepas XacHrpG y la cepa mutante complementada con HrpG fueron las únicas que mostraron una reducción en los halos de degradación de proteínas en las placas de agar-leche (figura 5.9, tabla 5.1). En un trabajo reciente se realizó un estudio bioinformático en búsqueda de genes controlados por reguladores *hrp* en el genoma de varias bacterias fitopatógenas y de estos análisis se encontraron en particular proteasas secretadas por el SSTT de Xac que están reguladas a nivel transcripcional por HrpG y HrpX (Yamazaki y col., 2008a). Previamente en otros trabajos también se observó una relación entre las proteínas reguladoras del SSTT y proteasas secretadas por el SSTT en *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). En esta bacteria, la mutación puntual E44K en HrpG, descrita anteriormente y que activa constitutivamente el cluster *hrp* (Wengelnik y col., 1999), es deficiente en la secreción de proteasas en placas de agar-leche mientras que la cepa salvaje y mutantes delecionadas en *hrpG* y *hrpX* forman halos de actividad proteasa de igual magnitud (Noël y col., 2001). Mediante análisis de cDNA-AFLP se determinó que HrpX de Xcv regula positivamente un regulador transcripcional de la familia MarR (del inglés, multiple antibiotic resistance regulator), denominado XCV1512, que regula negativamente una proteasa extracelular (Noël y col., 2001). Por otro lado, se vio que XCV1512 posee un 84 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con HpaR, una proteína putativa de la familia MarR de *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc), que estaría involucrada en la respuesta HR, la patogenicidad y la producción de proteasas extracelulares (Wei y col., 2007). La deleción de *hpaR* en Xcc produjo la pérdida de virulencia en plantas hospedadoras de repollo y una disminución de la respuesta HR en plantas no hospedadoras de pimiento, además de un aumento en la producción de proteasas extracelulares. Mediante fusiones reporteras al gen *gusA* se determinó que la expresión de *hpaR* está controlada positivamente por HrpG y HrpX, es reprimida en medio rico y está altamente inducida en medio mínimo e *in planta* (Wei y col., 2007). En conjunto estos resultados sugieren que un homólogo a *hpaR* y una cascada regulatoria similar, donde HrpX regula positivamente la expresión de *hpaR* que a su vez controla

negativamente la producción de proteasas extracelulares, también podría existir en Xcv y Xac.

Recientemente se observó que HrpG y HrpX controlan negativamente a nivel transcripcional, la síntesis de α -amilasa, una enzima extracelular secretada por el SSTD, en la cepa *X. axonopodis* pv. *citri* NA-1 (XAC NA-1) (Yamazaki y col., 2008b). Los ensayos realizados con las cepas construidas en esta tesis no permiten establecer una relación directa entre HrpG y la secreción de enzimas amilasas. Sin embargo, en la cepa XAC NA-1 delecionada en los genes *hrpG* y *hrpX*, se observó mayor actividad amilasa respecto de la cepa salvaje, sugiriendo que estos genes actuarían como reguladores negativos de la expresión o secreción de amilasas extracelulares (Yamazaki y col., 2008b). En la cepa 306 de Xac que fue secuenciada (da Silva y col., 2002) se reportaron tres α -amilasas en el cromosoma, XAC0154, *amy* (XAC0798) y XAC3490. La mutante Δamy de XAC NA-1 no produce amilasas extracelulares y el crecimiento *in planta* de esta cepa fue tres o cuatro veces mayor que el de la cepa salvaje, sugiriendo que el gen *amy* podría restringir el crecimiento de la bacteria en la planta hospedadora (Yamazaki y col., 2008b). A pesar de que todavía no se conoce el rol de estas enzimas en la patogenicidad, o el mecanismo por el cual HrpG y HrpX regulan la expresión o secreción de las mismas, se piensa que podrían inhibir la multiplicación *in planta* y se propuso que los productos de degradación de la actividad α -amilasa actuarían como elicitores que inducen la respuesta innata de la planta para contrarrestar el ataque del patógeno. En este contexto HrpG, a través de HrpX, controlaría negativamente la expresión de los genes α -amilasa para favorecer la colonización de los tejidos vegetales (Yamazaki y col., 2008b). En un estudio de mutagénesis mediada por transposones en la cepa 306 de Xac (da Silva y col., 2002) se detectó una mutación en el gen *amy* (XAC0798) que mostró una patogenicidad alterada, sin síntomas de enfermedad en plantas hospedadoras pero con un fenotipo del tipo HR (Laia y col., 2009), indicando nuevamente la participación de esta enzima en la colonización y multiplicación de Xac en los tejidos vegetales.

La pared celular vegetal está compuesta principalmente por celulosa y hemicelulosa, y por lignina, pectina y otros compuestos cuya composición varía según la especie vegetal. Xac contiene en su genoma enzimas que degradan la pared celular y las mismas se vieron expresadas en medio XVM2 (da Silva y col., 2002; Astua-Monge y col., 2005), sin embargo se sabe muy poco sobre la capacidad de Xac para degradar celulosa. Recientemente, se encontró una mutante insercional en el gen *xpsD* de Xac, un

componente del SSTD, que mostró deficiencia en la degradación de carboximetilcelulosa en ensayos en placa (Baptista y col., 2010). Además de la deficiencia en la degradación de celulosa, esta cepa produjo un retardo en la aparición de los síntomas de cancrrosis sin llegar a desarrollar necrosis al ser inoculada en plantas hospedadoras; y el crecimiento *in planta* también se vio reducido en comparación con la cepa salvaje. Incluso se observó una alteración en la secreción de otras proteínas, al igual que en *X. campestris* pv. *campestris* donde se relacionó al gen *xpsD* con la secreción de numerosas enzimas extracelulares (Hu y col., 1992). En *Xac* se detectaron al menos 8 genes que codifican sustratos del SSTD mediante estudios de microarreglos, 7 de ellos fueron reprimidos en las mutantes Δ hrpG y Δ hrpX, mientras que uno de ellos (*pglA* (XAC2374)) sólo se observó reprimido en la mutante Δ hrpX. De estos genes, *pglA* (XAC2374) y *phe-1* (XAC0661), codifican enzimas que degradan la pared celular (Guo y col., 2011). El análisis en placas realizado con las cepas construidas en esta tesis no permite establecer una relación directa entre el regulador HrpG del SSTT y la secreción o actividad de las celulasas bacterianas, sin embargo estos resultados no excluyen la posibilidad de que dicha relación pueda existir, así como existen cascadas regulatorias que involucran a HrpG y HrpX con la secreción de proteasas extracelulares. *Xac* coloniza los tejidos vegetales a través de estomas o heridas y el aspecto de las lesiones que produce no parecen involucrar la degradación de la pared celular, sin embargo los resultados de Baptista y col. (2010) muestran que *Xac* es capaz de hidrolizar celulosa, y esto, junto con otros factores de virulencia secretados por el SSTD, podría facilitar el ensamblado de estructuras extracelulares como el pilus Hrp del SSTT o el apéndice extracelular del SSTC que son esenciales para la translocación de proteínas efectoras y otras moléculas al citosol de las células vegetales (Büttner y Bonas, 2010).

La movilidad bacteriana es necesaria para numerosos procesos celulares como las respuestas tácticas (quimiotaxis, aerotaxis), la adhesión, la asociación en comunidades microbianas como el biofilm, la secreción de factores de virulencia y la colonización de plantas y animales hospedadores en el caso de bacterias patógenas. El flagelo es una de las estructuras bacterianas responsables de la movilidad, formado por más de 20 proteínas estructurales y otras 30 que participan en su regulación y ensamblado (Bardy y col., 2003). Está formado por tres subestructuras mayoritarias: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. El cuerpo basal es el motor que impulsa la rotación flagelar y ancla el flagelo a las membranas interna y externa bacterianas; el gancho conecta el filamento al

cuerpo basal, es una proteína curvada y flexible que convierte el movimiento rotacional en olas; y el filamento, compuesto por la proteína flagelina, es una estructura hueca y helicoidal que propaga las olas iniciadas por el gancho y propulsa a la bacteria a través del medio en el que se encuentra (Macnab y Parkinson, 1991). Los componentes del flagelo son capaces de autoensamblarse, mediante un sistema de secreción de tipo III específico a través del cual se pueden translocar los componentes proteicos del flagelo a sus posiciones correspondientes (Minamino y Namba, 2004). El flagelo generalmente permite dos tipos de movi­lidades bacterianas: el swimming, que es un movimiento individual en un medio líquido; y el swarming, que es un movimiento coordinado entre un grupo de células sobre la superficie de un medio sólido o semisólido (Henrichsen, 1972). En el swimming las células se mueven independientemente, intercalando períodos de nado suave interrumpidos por tumbos cortos en forma aparentemente desorganizada y presentan sólo uno o dos flagelos polares (Alberti y Harshey, 1990). El movimiento de swarming sobre una placa de agar se desarrolla debido a la diferenciación de las células del borde de una colonia a células hiperflageladas, multinucleadas y largas que pueden moverse sobre la superficie del agar, y junto con el crecimiento bacteriano logran una colonización rápida del medio (Alberti y Harshey, 1990; Kearns, 2010). Varios compuestos extracelulares, como polisacáridos y biosurfactantes facilitan la translocación sobre la superficie (Lindum y col., 1998; Kearns, 2010). El desarrollo de una colonia de swarming también requiere la integración de múltiples señales ambientales, señales célula-célula y señales intracelulares (Alberti y Harshey, 1990). Debido a la similitud estructural entre el SSTT y la estructura y biosíntesis del flagelo (Erhardt y col., 2010), se realizaron los ensayos en placa a fin de encontrar una relación entre el regulador HrpG y la movilidad bacteriana, aunque en ninguna cepa de las construidas se pudo observar una diferencia significativa respecto de la cepa salvaje. Sin embargo, Guo y col. (2011) encontraron numerosos genes involucrados en la movilidad y quimiotaxis bacteriana que son regulados transcripcionalmente en la mutante en *hrpG* de *Xac*. Por ejemplo *fliJ*, un gen flagelar que responde a estímulos quimiotácticos se observó inducido, mientras que otros genes flagelares como *motB* y *fliO* se encontraron reprimidos en fase de crecimiento exponencial; y varios genes se encontraron sobreexpresados en fase estacionaria, como *cheA*, *cheW*, *cheY* y otros relacionados con la biosíntesis del flagelo. Para corroborar estos resultados obtenidos en el microarreglo Guo y col. (2011) realizaron ensayos en placa pero no observaron diferencias entre la mutante *hrpG* y la cepa salvaje respecto al

swimming, mientras que la mutante mostró mayor movilidad del tipo swarming luego de 13 días de inoculación en placas de XVM2 al 0,7 % de agar. Los resultados obtenidos con las cepas de Xac construidas en esta tesis, que no muestran diferencias con la cepa salvaje, pueden deberse a que se realizaron en placas con un medio rico como el SB y no en el medio mínimo XVM2 inductor del SSTT. Los resultados obtenidos por Guo y col. (2011) sugieren que puede existir una estrecha relación entre HrpG y la movilidad bacteriana durante el proceso infectivo de Xac que debería estudiarse en profundidad.

La proteína HrpG es un regulador transcripcional por lo que se evaluó la expresión génica de las cepas XacHrpG, XacR210C, la cepa mutante y las cepas complementadas construidas mediante RT-PCR. En conjunto los resultados demuestran que al igual que en otras bacterias del género, la expresión de los genes del cluster *hrp* está reprimida en medio de cultivo rico (figura 5.12) y se induce en el medio mínimo XVM2 (figura 5.13) e *in planta* (figura 5.14). Además, la sobreexpresión de HrpG permite la inducción de los genes del cluster aún en condiciones no inductoras, y HrpG de Xac es esencial para la activación transcripcional de los genes *hrp* ya que la mutante $\Delta hrpG$ no es capaz de activar la transcripción de los mismos. Estos resultados coinciden con lo observado en Xcv donde la mutante en *hrpG* no permite la inducción de los loci del cluster *hrp* (*hrpA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F* y *hrpX*) aún en condiciones inductoras como el medio XVM2 (Wengelnik y col., 1996b). Por otro lado, la mutación puntual E44K en la secuencia de HrpG de Xcv conduce a la expresión constitutiva de los genes del cluster en medio rico no inductor del SSTT (Wengelnik y col., 1999), similar a lo que ocurre con la cepa sobreexpresante XacHrpG. En el estudio por microarreglos realizado por Guo y col. (2011) se identificaron en Xac genes del SSTT y algunos efectores regulados por HrpG y HrpX que ya habían sido descritos en Xcv (Wengelnik y col., 1996b; Wengelnik y col., 1999; Wengelnik y Bonas 1996). Al igual que en Xac, en Xcv las cepas mutantes en los genes *hrp* no son capaces de multiplicarse *in planta*. Esto podría deberse a una reacción de defensa inespecífica de la planta como la deposición de calosa en la pared celular de los tejidos vegetales que se observa en el caso de las inoculaciones con las cepas mutantes y no con la cepa salvaje, sugiriendo que los genes *hrp* podrían suprimir estas respuestas de defensa (Bonas y col., 2000). El regulador mutante R210C no es capaz de inducir la expresión de los genes analizados por RT-PCR en la cepa mutante complementada. Sin embargo, en la cepa sobreexpresante XacR210C se detectó una leve inducción de ciertos genes en medio XVM2 e *in planta*, seguramente debido a la presencia de la copia salvaje de HrpG. Estos resultados junto con la ausencia

de síntomas típicos de cancrrosis que muestra XacR210C en hojas de naranja, la ausencia de respuesta HR en plantas no hospedadoras, el reducido crecimiento *in planta*, y la incapacidad de revertir el fenotipo de la cepa Δ hrpG, indicarían que R210C no es funcional. En la cepa XacR210C, existe una copia salvaje de HrpG, y a pesar de que no se pudo determinar el nivel de transcripción de R210C en esta cepa debido a sus características genotípicas, se puede inferir que R210C se expresa a partir del plásmido replicativo produciendo una proteína mutante que no es funcional pero probablemente compite con el correcto funcionamiento de HrpG, ya sea por un incorrecto plegamiento del polipéptido, una interacción proteína-proteína con HrpG impidiendo su correcto funcionamiento o la unión de R210C a las regiones promotoras compitiendo con la unión de HrpG y evitando la activación transcripcional de los genes regulados por HrpG.

Utilizando la cepa mutante de Xac en *hrpG* y una cepa mutante en *hrpX*, Guo y col. (2011) realizaron un estudio de microarreglos de ADN en todo el genoma de Xac para caracterizar los regulones HrpG y HrpX, esenciales para la patogenicidad. Estudios previos de arreglos de genes mediante chips para el análisis de la expresión génica en Xac aportaron datos importantes en la caracterización de los genes de patogenicidad y virulencia (Astua-Monge y col., 2005; Moreira y col., 2010a). En el primero se representaron sólo 279 genes del genoma de Xac, pero permitió la identificación de 37 genes diferencialmente expresados en el medio mínimo XVM2 en relación con un medio de cultivo rico en nutrientes, entre los que se destacaron genes *hrp*, genes de proteínas efectoras (como *avrXacE1* y *avrXacE2*, inducidos en XVM2), enzimas que degradan la pared celular, proteínas del tipo adhesinas, peptidasas, nucleasas y proteínas relacionadas con la biosíntesis del EPS xantano, el LPS y aquellas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo, entre otras (Astua-Monge y col., 2005). Si bien la regulación de los genes inducidos en XVM2 se ha asociado con la presencia de la caja PIP en las regiones promotoras de los genes, a la cual se une la proteína reguladora HrpX (Fenselau y Bonas, 1995), Astua-Monge y col. (2005) determinaron un nuevo motivo conservado en los promotores de los genes inducidos en XVM2, que consiste en 8 bases conservadas (ATCGATGC). Este motivo se encontró en 125 genes con función desconocida y podría ser el sitio de unión de alguna proteína reguladora aún desconocida. Moreira y col. (2010a) desarrollaron y validaron una plataforma de microarreglos que permite analizar 2365 marcos abiertos de lectura que representan el 52,7% de las secuencias anotadas en el genoma de Xac, sin embargo Guo y col. (2011) desarrollaron un microarreglo que

permitió analizar las 4427 proteínas anotadas de Xac. En ese trabajo se encontraron 232 y 181 genes pertenecientes al regulón HrpG y HrpX, respectivamente, con un centenar de ellos solapados entre ambos regulones, analizados en distintos estadios de crecimiento de Xac en medio XVM2 (Guo y col., 2011). Se observó que HrpG y HrpX regulan los genes del SSTT, genes efectores secretados por el SSTT, y genes secretados por el SSTD. En general, los resultados sugieren que Xac regula múltiples actividades celulares en respuesta al ambiente de la planta hospedadora, como la biosíntesis de aminoácidos, la fosforilación oxidativa, la vía de pentosas-fosfato, el transporte de azúcar, hierro y potasio, y el catabolismo de compuestos fenólicos a través de las proteínas regulatorias HrpG y HrpX (Guo y col., 2011).

Como otros patógenos, las especies de *Xanthomonas* han desarrollado diversos sistemas regulatorios para adaptar la expresión de factores de virulencia a diferentes estímulos extracelulares como la población o densidad bacteriana, la disponibilidad de nutrientes, los niveles de oxígeno y la presencia de moléculas derivadas de la planta (Büttner y Bonas, 2010). Los mecanismos de quorum sensing, por ejemplo, permiten asegurar que los factores de virulencia bacterianos se expresen sólo cuando el número de células es suficiente para colonizar al hospedador y evitar así respuestas de defensa prematuras que limiten la multiplicación microbiana (Thowthampitak y col., 2008). La percepción y transducción de las señales externas generalmente está mediada por sistemas de transducción de señales de dos componentes que consisten en una histidina quinasa sensora asociada a la membrana plasmática y un regulador de respuesta citoplasmático que mediante autofosforilación de la quinasa sensora y posterior transferencia del grupo fosfato al regulador de respuesta se activa la transcripción de genes de interés para responder ante el estímulo detectado (Qian y col., 2008a). En *X. campestris* pv. *campestris* existen 450 quinasas sensoras y reguladores de respuesta predichos por comparación de secuencias, aunque algunos pocos se han estudiado en profundidad como por ejemplo el sistema RpfC/RpfG (involucrado en el quorum sensing y la regulación de factores de virulencia), ColR/ColS (que contribuye a la expresión de genes *hrp*) y el regulador de respuesta HrpG esencial para la expresión de los genes *hrp* (Qian y col., 2008b; Zhang y col., 2008).

En conjunto el estudio global de los factores de virulencia bacterianos y su regulación en diversas *Xanthomonas* durante los últimos años sugieren que HrpG y HrpX participarían de una red de señalización global y coordinarían la expresión de múltiples

factores de virulencia que modifican y adaptan el ambiente de la célula hospedadora durante una infección. Estas proteínas regulatorias activan y reprimen la expresión de numerosos genes, de manera directa o indirecta a través de otras proteínas regulatorias (Büttner y Bonas, 2010; Guo y col., 2011). La co-regulación del SSTT con otros sistemas de secreción y funciones celulares facilitan el crecimiento *in planta* y la adaptación a las respuestas de defensa de la planta. Además HrpG regula genes de manera independiente de HrpX, consistente con el modelo de que HrpG se encuentra por encima de HrpX en la cascada regulatoria e indicando que HrpG actuaría como un regulador maestro en los procesos patogénicos de Xac (Guo y col., 2011) y en general en todas las especies de Xanthomonas.

CAPITULO III

*CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA
PROTEÍNA REGULATORIA HRPB DE
XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI*

6. CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROTEÍNA REGULATORIA HRP G DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI*

6.1-Introducción

La proteína HrpG de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) es un regulador transcripcional de la superfamilia de reguladores OmpR/PhoB (Martínez-Hackert y Stock, 1997b) y controla entre otras funciones celulares la expresión del cluster *hrp*, esencial para el ensamblado del sistema de secreción de proteínas tipo tres (SSTT) que permite a Xac colonizar los tejidos vegetales de sus plantas hospedadoras produciendo la enfermedad cancrrosis de los cítricos. En *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) se ha propuesto un modelo regulatorio que involucra a HrpG como principal regulador del cluster *hrp* (Wengelnik y col., 1996b). La alta homología entre las proteínas HrpG de Xcv y Xac; y la similitud en la composición y organización del cluster *hrp* entre estas bacterias, permiten suponer mecanismos regulatorios similares. Por otro lado, el comportamiento de las cepas de Xac construidas con el regulador mutante R210C, en la interacción con plantas hospedadoras y no plantas hospedadoras, indican que la mutación puntual en la proteína es crítica para el correcto funcionamiento del regulador.

A fin de comprender los fenotipos observados con las cepas de Xac que contienen el regulador R210C y utilizando esta proteína mutante como una herramienta molecular para caracterizar funcionalmente al regulador transcripcional HrpG, se estudió la capacidad de interacción de las proteínas con secuencias regulatorias de ADN. Mediante herramientas bioinformáticas se determinaron regiones promotoras putativas de genes regulados por HrpG y luego de purificar las proteínas HrpG y R210C se realizaron ensayos de retardo en gel como se describe a continuación.

6.2-Identificación de regiones promotoras de genes regulados por HrpG

6.2.1-Participación de HrpG en la regulación transcripcional del cluster *hrp*

Como se mencionó en la sección 1.6 de Introducción, en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), se propuso un modelo regulatorio que se muestra en detalle en la figura 6.1. Mediante experimentos con cepas mutantes y ensayos con fusiones

transcripcionales a genes reporteros, Wengelnik y col. (1996b), propusieron un modelo de regulación que involucra a las proteínas HrpG y HrpX del cluster *hrp*.

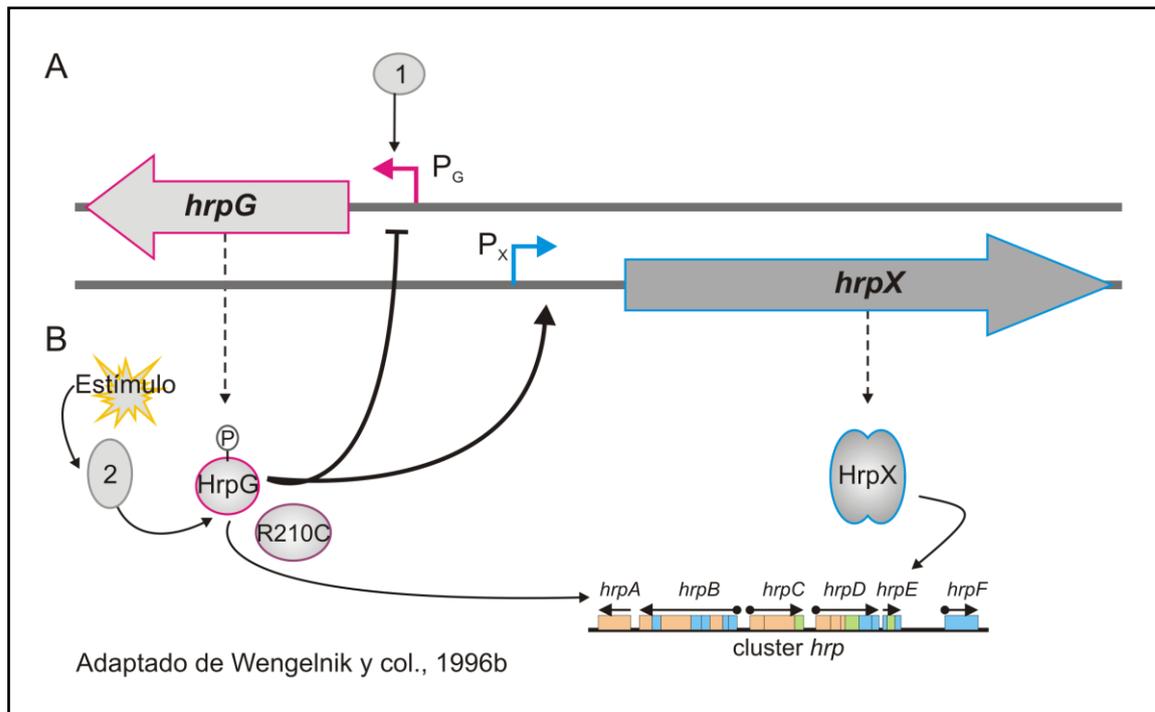


Figura 6.1. Modelo regulatorio del cluster *hrp* propuesto para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

A: organización genética de *hrpG* (rosa) y *hrpX* (celeste) en el genoma de *Xanthomonas*. Los genes están codificados en hebras complementarias del ADN y se transcriben de manera divergente en direcciones opuestas. En la región intergénica se muestran los promotores de ambos genes (P_G y P_X) en posiciones arbitrarias. 1: señala un regulador transcripcional de *hrpG* aún no identificado. B: ante la presencia de un estímulo, una histidina quinasa sensora probablemente asociada a la membrana y aún no identificada (señalada con el número 2) fosforila y activa HrpG. Posteriormente, HrpG activa (punta de flecha) la transcripción de P_X y *hrpA*; y reprime (punta de línea) la transcripción de P_G . Finalmente, HrpX en forma de dímero activa la transcripción del resto del cluster *hrp*. La función de la proteína mutante R210C (violeta) aún se desconoce. Adaptado de Wengelnik y col., 1996b.

En este modelo, cuando la bacteria se encuentra en el interior de la planta o en medios de cultivo mínimos, algún estímulo aún no identificado activaría la proteína HrpG. Se propuso que HrpG formaría parte de un sistema de dos componentes bacteriano típico, en el cual una proteína quinasa sensora probablemente asociada a la membrana interna citoplasmática, al percibir el estímulo se autofosforilaría en un residuo de histidina y luego transferiría el grupo fosfato a un residuo conservado de ácido aspártico del dominio N-terminal de HrpG que se comportaría como la proteína reguladora de respuesta (figura 6.1). HrpG activado se uniría a regiones promotoras del gen *hrpX* y el

locus *hrpA* activando su transcripción. Al mismo tiempo HrpG reprimiría su propia transcripción. El resto del cluster *hrp* (del locus *hrpB* a *hrpF*) se activaría a través del regulador HrpX, de la familia AraC, que actuaría como un homodímero (figura 6.1). En *Xcv* y otras *Xanthomonas* aún no se ha identificado una quinasa sensora asociada a HrpG, tampoco se conocen los mecanismos de modificación post-traduccionales como la fosforilación y dimerización de la proteína que conducirían a su activación. La regulación transcripcional de HrpG también se desconoce, es decir los factores o sistemas regulatorios involucrados y las secuencias regulatorias en su región promotora que son esenciales para su regulación (figura 6.1). El número y la organización de los genes del cluster *hrp* de *Xac* están altamente conservados con sus homólogos en *Xcv* (sección 1.6 de Introducción), por lo que este modelo de regulación podría aplicarse también a este fitopatógeno. Hasta el momento no existen evidencias experimentales que confirmen la capacidad de HrpG de unirse a las secuencias promotoras de los genes *hrpX* y *hrpG*, entre otros genes que regula. Por tal motivo, se estudió si HrpG y R210C son capaces de reconocer y unirse a las regiones promotoras de los genes mencionados.

6.2.2-Selección y análisis *in silico* de secuencias promotoras

A fin de analizar la capacidad de unión de las proteínas HrpG y R210C a secuencias regulatorias del ADN, la región intergénica de 824 pb de longitud entre los genes *hrpG* y *hrpX* de *Xac* que se transcriben en direcciones opuestas y están codificados en hebras complementarias del ADN (figura 6.1A), se dividió en dos regiones promotoras que se denominaron P_{hrpG} y P_{hrpX} , respectivamente. La región de ADN que contiene el promotor del gen *hrpG* (P_{hrpG}) comprende 460 pb desde el nucleótido -412 a +48 relativo al codón ATG de inicio de la traducción (figura 6.2A). La región de ADN que contiene el promotor del gen *hrpX* (P_{hrpX}) tiene una longitud de 444 pb y se extiende desde el nucleótido -414 a +30 relativo al codón de inicio ATG (figura 6.2B). Ambos fragmentos comprenden regiones distintas del genoma y solamente tienen en común 2 bases nucleotídicas del extremo no codificante de cada fragmento.

Mediante distintas herramientas bioinformáticas se analizó la presencia de secuencias promotoras características de procariontes en las regiones de ADN seleccionadas (sección 3.18 de Materiales y Métodos).

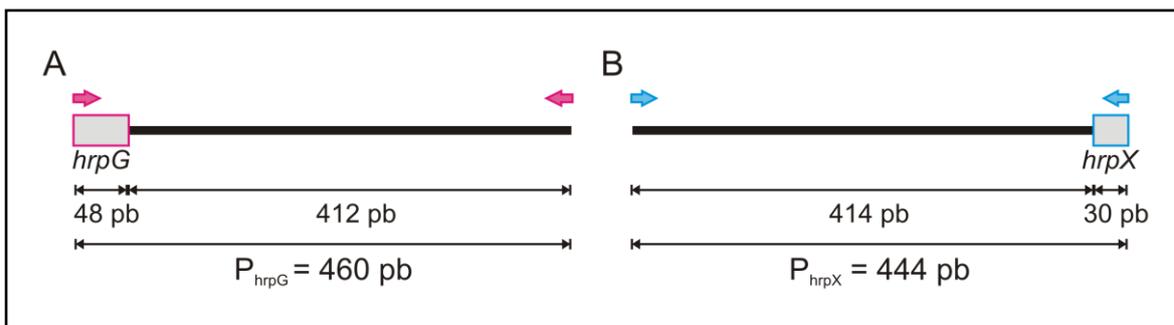


Figura 6.2. Regiones promotoras de los genes *hrpG* y *hrpX*.

Los esquemas muestran los fragmentos de ADN seleccionados que contienen las secuencias promotoras de los genes *hrpG* (A) y *hrpX* (B) de *Xac*. Se muestran las zonas de hibridación de los oligonucleótidos específicos para amplificar cada fragmento, pHrpG up y pHrpG down (flechas rosas en A); pHrpX up y pHrpX down (flechas celestes en B). Se indica la longitud total de cada fragmento y la cantidad de pb de la región no codificante y codificante de cada gen (recuadros) que están incluidas en los fragmentos.

En la región promotora P_{hrpG} no se encontraron predicciones de regiones -10 o -35 típicas de reconocimiento de la subunidad $\sigma 70$ de la ARN polimerasa y tampoco se encontraron secuencias de homología a secuencias consenso de reconocimiento de factores de transcripción de la familia OmpR. Hasta el momento, tampoco se pudieron identificar secuencias de ADN específicas en la región promotora de *hrpG* de *Xcv* (Wengelnik y col., 1996b). Cabe destacar que a diferencia del regulador PhoB donde los sitios de unión están altamente conservados, en el caso de OmpR existe muy poca conservación de las bases de ADN reconocidas por la proteína y por lo tanto son difíciles de predecir (Rhee y col., 2008). Por el contrario, en la región promotora denominada P_{hrpX} , se encontraron numerosas secuencias conservadas e incluso se predijo un sitio de inicio de la transcripción, que consiste en una base de citosina 77 bases corriente arriba del codón ATG de inicio de la traducción del gen *hrpX*. En *Xcv* se definió el sitio de inicio de la transcripción mediante la técnica de extensión del cebador y se determinó la posición +1 en una base de guanina 59 pb corriente arriba del codón ATG de *hrpX* (Wengelnik y Bonas, 1996), es decir a 17 bases del sitio de inicio predicho con los servidores de internet para P_{hrpX} de *Xac* (figura 6.3, tabla 6.1). Además, se identificaron regiones -10 y -35 que podrían ser reconocidas por la subunidad $\sigma 70$ y mediante la herramienta “Virtual footprinting” se encontraron secuencias que podrían ser reconocidas por el factor de transcripción OmpR, perteneciente a la misma familia de reguladores que HrpG (figura 6.3, tabla 6.1). En *Xcv* también se identificó una secuencia con homología a las secuencias -10 de reconocimiento de la subunidad $\sigma 70$ de la ARN

polimerasa, pero no se encontraron secuencias regulatorias -35 y cajas PIP (promotor inducible *in planta*) que poseen la secuencia consenso TTCGC-N₁₅-TTCGC, y que están presentes en genes regulados por HrpX (Wengelnik y Bonas, 1996). Estos análisis bioinformáticos sugieren que el promotor P_{hrpX} contiene elementos característicos de promotores procariotas y secuencias de reconocimiento de proteínas de la familia OmpR, y por lo tanto podría ser reconocido por HrpG.

```

CAGTGATCTGCCCTCGTGTCATGTCTGCTTCTCTCGATCAAATGCGCTTGGGCATACGTGTCCG
TACAGTCATCGGGCATCGCCTTGGTCATCGCCGACAGCCATCAATGCGCATGGACGCAGCGCGT
TCGCAGACGTTGTCCGACTGTGCCTTGGATATTGGCGCAGACCGGCGACATCAATACTCAACCG
GATGGCGCGAAATGTCTGGCGTTACGACGACGTCGACGGTGTGCAACTGCGCTTTCGCGCCGCGA
AAAAACGCATCACATGGATGTTTGACAGAGTGAGCTTTTTTGATTTTTTCGATGGCTTTCAGAG
AGAAATTCTATTGGATCCGCTGCATACAATCGTTTTCGCCAGCGAGTTAGGCGCCTGTTGTCTT
TTGCTCCGCCCCCAAGAGAGAGACCGGCATGATCCTTCCACTTACTTTGCAGCGATC
    
```

Figura 6.3. Secuencia del promotor putativo P_{hrpX} e identificación de elementos promotores mediante predicciones bioinformáticas.

Se muestra la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN denominado P_{hrpX}, que contiene la región promotora del gen *hrpX* de *Xac*, desde la base -414 hasta la base +30 respecto del codón ATG de inicio de la traducción. Las regiones subrayadas, resaltadas en gris y con letras de colores corresponden a secuencias promotoras putativas, cajas -10 y -35, secuencias de reconocimiento de factores de transcripción y parte de la secuencia codificante de *hrpX*. Cada una de estas secuencias, sus características y el programa con el cual se realizó el análisis bioinformático se indican en detalle en la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Cajas regulatorias de la región promotora putativa P_{hrpX}.

Secuencia	Característica	Programa
ATGATCCTTCCACT TACTTTGCAGCGATC	Secuencia codificante <i>hrpX</i> hasta posición +30 del codón ATG de inicio de la traducción	
TTTTTCGAT	Caja -10, σ 70	BProm, Softberry
TTGACA	Caja -35, σ 70	BProm, Softberry
<u>GATTTTTTCGATGGCTT</u> <u>TCAGAGAGAAATTCTAT</u> <u>TGGATCCGCTGCATAC</u>	Secuencia promotora y sitio putativo de inicio de la transcripción (C)	Neural network
TACAAT	Caja -10, σ 70 <i>E. coli</i>	Virtual footprinting
ATTCTA	Caja -10, σ 70 <i>E. coli</i>	Virtual footprinting
GAAAAAA	Secuencia de reconocimiento factor de transcripción OmpR de <i>E. coli</i> , en la hebra +	Virtual footprinting
TTTTTC	Secuencia de reconocimiento factor de transcripción OmpR de <i>E. coli</i> , en la hebra -	Virtual footprinting
G	Sitio de inicio de la transcripción determinado para <i>hrpX</i> de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xcv)	Wengelnik y Bonas, 1996

6.2.3-Estudio de la funcionalidad de las secuencias promotoras

Las fusiones transcripcionales son herramientas importantes para comprender la regulación y expresión génica (Miller y col., 2000). Por ello, con el objetivo de determinar si las regiones promotoras seleccionadas son funcionales, se amplificaron por PCR con pares de oligonucleótidos específicos (figura 6.2) y se clonaron en el vector reportero pPROBE-NT (sección 3.16 de Materiales y Métodos). Este vector permite el clonado de secuencias promotoras corriente arriba del gen reportero que codifica la proteína verde fluorescente GFP; y mediante la determinación de la fluorescencia emitida se puede determinar si la secuencia promotora es activa y frente a qué condiciones o estímulos se induce o reprime (Miller y col., 2000). Para ensayar la funcionalidad de estas regiones promotoras, las construcciones reporteras en el vector pPROBE-NT se conjugaron en la cepa salvaje de *Xac* y en la cepa mutante *XacΔhrpG* y se crecieron cultivos en medio mínimo XVM2. Se analizó la fluorescencia emitida por GFP de cada cepa reportera en relación con cepas controles conjugadas con el vector vacío y los datos obtenidos se muestran en la figura 6.4 como valores de inducción relativa. En la cepa salvaje de *Xac*, ambas secuencias promotoras P_{hrpX} y P_{hrpG} , mostraron una inducción de la fluorescencia de GFP de aproximadamente 3 y 5 veces en relación a la cepa conjugada con el vector vacío, respectivamente. Esto indica que en el contexto genómico de la cepa salvaje de *Xac* y en medio XVM2, las secuencias promotoras seleccionadas poseen elementos regulatorios que son reconocidos por diferentes factores de transcripción y la ARN polimerasa para activar la transcripción del gen reportero *gfp*. Cuando las construcciones reporteras se introdujeron en la cepa mutante *XacΔhrpG*, no se observó inducción de la fluorescencia de GFP con la región promotora P_{hrpX} respecto de la misma cepa conjugada con el vector vacío (figura 6.4). Este resultado indicaría que la transcripción de *hrpX* de *Xac* depende de la presencia de la proteína reguladora HrpG. Por el contrario, la región promotora P_{hrpG} mostró una inducción mayor en *XacΔhrpG* que en *Xacwt*, alcanzando un nivel de inducción 8 veces mayor en relación a la cepa con el vector vacío, e indicando que HrpG actuaría como un regulador negativo sobre su propia transcripción. Estos resultados, permitieron verificar que las regiones elegidas como promotores de los genes *hrpX* y *hrpG* contienen elementos funcionales capaces de activar la transcripción del gen reportero *gfp*. De estos análisis surge que, al igual que lo observado en *Xcv* mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *gus* (Wengelnik y col., 1996b), HrpG de *Xac*

regula positivamente el gen *hrpX*, mientras que una auto-regulación negativa podría estar afectando al promotor de *hrpG*.

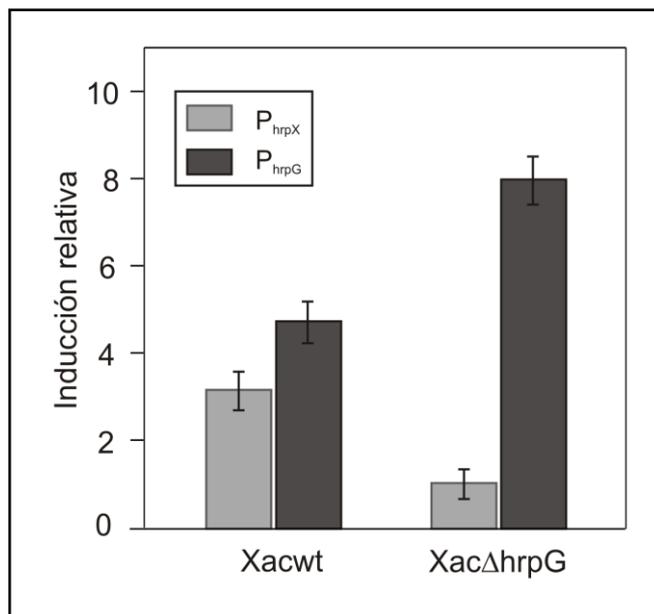


Figura 6.4. Actividad transcripcional de las regiones promotoras P_{hrpX} y P_{hrpG} .

Las fusiones transcripcionales de los promotores P_{hrpX} y P_{hrpG} al gen reportero *gfp* en el vector pPROBE-NT, se introdujeron en la cepa salvaje de *Xac* (*Xacwt*) y la cepa mutante en el gen *hrpG* (*XacΔhrpG*). El vector reportero vacío se introdujo en ambas cepas y estas construcciones se utilizaron como control para relativizar el valor de la fluorescencia emitida por GFP en cada cepa reportera. Todas las cepas se crecieron en medio XVM2. El experimento se repitió 3 veces. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores promedio de inducción relativa.

6.3- Caracterización de la interacción del regulador HrpG y el regulador mutante R210C con las regiones promotoras de los genes *hrpX* y *hrpG*

6.3.1- Clonado, expresión y purificación de HrpG y R210C como proteínas de fusión

A fin de realizar los ensayos de interacción con el ADN, se clonaron, expresaron y purificaron la proteína salvaje HrpG y la proteína mutante R210C de *Xac*. Para esto, se amplificaron las secuencias codificantes de ambas proteínas mediante PCR con los oligonucleótidos HrpGBamHIup y HrpGXholdown (tabla 3.4 de Materiales y Métodos) a partir de las construcciones pBBR1MCS-3-HrpG y pBBR1MCS-3-R210C (detallado en la sección 3.4.1 de Materiales y Métodos). Los productos de amplificación se clonaron en el vector de expresión pET28a (tabla 3.3 de Materiales y Métodos) y las construcciones obtenidas se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3) pLys S` (tabla 3.1 de Materiales y Métodos). En este vector las proteínas se expresaron con 6 residuos de histidina fusionados a su extremo *N*-terminal, pero en diferentes condiciones ensayadas

no se observó presencia de ninguna de las dos proteínas en estado soluble en los extractos bacterianos inducidos (datos no mostrados). Posteriormente, las secuencias codificantes de HrpG y R210C se clonaron en el vector de expresión pET32-am (tabla 3.3 de Materiales y Métodos), obteniendo las construcciones pET32-am-HrpG y pET32-am-R210C, respectivamente. En este vector las proteínas se expresan fusionadas a tiorredoxina (Trx) y una secuencia de 6 residuos de histidinas en tándem fusionadas al extremo *N*-terminal de cada secuencia codificante. Luego de verificar los clonados por secuenciación, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLys S', en las que se llevó a cabo la expresión de las proteínas recombinantes y la purificación en columnas de Ni-agarosa que tiene afinidad por los residuos de histidinas. Se ensayaron distintas condiciones de expresión como la concentración del inductor IPTG que se varió entre 0,1 y 0,5 mM, la temperatura de crecimiento bacteriano se ensayó en el rango de 18 °C y 37 °C, y el tiempo de inducción se probó en el rango de 4 a 18 hs. En esta cepa de *E. coli* no se obtuvieron buenos rendimientos de las proteínas de interés. En particular, la proteína mutante R210C se obtuvo mayormente precipitada, probablemente en cuerpos de inclusión que luego del fraccionamiento celular se encontraron siempre en la fracción del pellet. Con el objetivo de obtener un mejor rendimiento de las proteínas en estado soluble, se transformaron las construcciones del vector pET32-am en otras cepas de expresión de *E. coli* (datos no mostrados), siendo la cepa BLR (tabla 3.1 de Materiales y Métodos) la que permitió obtener un mayor rendimiento de las proteínas recombinantes en la fracción soluble. Nuevamente, se ensayaron diferentes condiciones de inducción y las más favorables para la expresión de las proteínas recombinantes en esta cepa se obtuvieron al agregar el inductor IPTG a una concentración de 0,2 mM e incubación durante 18 hs a 18 °C, luego de que los cultivos alcanzaran una densidad óptica de 0,7-1,0 a 600 nm. Luego de la ruptura de las células por sonicación, el lisado fue clarificado por centrifugación y las proteínas fueron purificadas utilizando la resina de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) de acuerdo al protocolo detallado en Materiales y Métodos (sección 3.4.4). El tamaño esperado para las proteínas de fusión de acuerdo a lo calculado utilizando la herramienta ProtParam disponible en el servidor ExPASy (sección 3.18 de Materiales y Métodos) es de 43,25 kDa para Trx-HrpG y 43,19 kDa para Trx-R210C. A modo de ejemplo, en la figura 6.5 se muestran fotos representativas de geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), donde se sembraron alícuotas de 10 µl de las fracciones obtenidas durante una purificación de las proteínas recombinantes

HrpG y R210C (figura 6.5A y B, respectivamente). Las proteínas purificadas tienen pesos moleculares similares al estimado mediante la herramienta bioinformática.

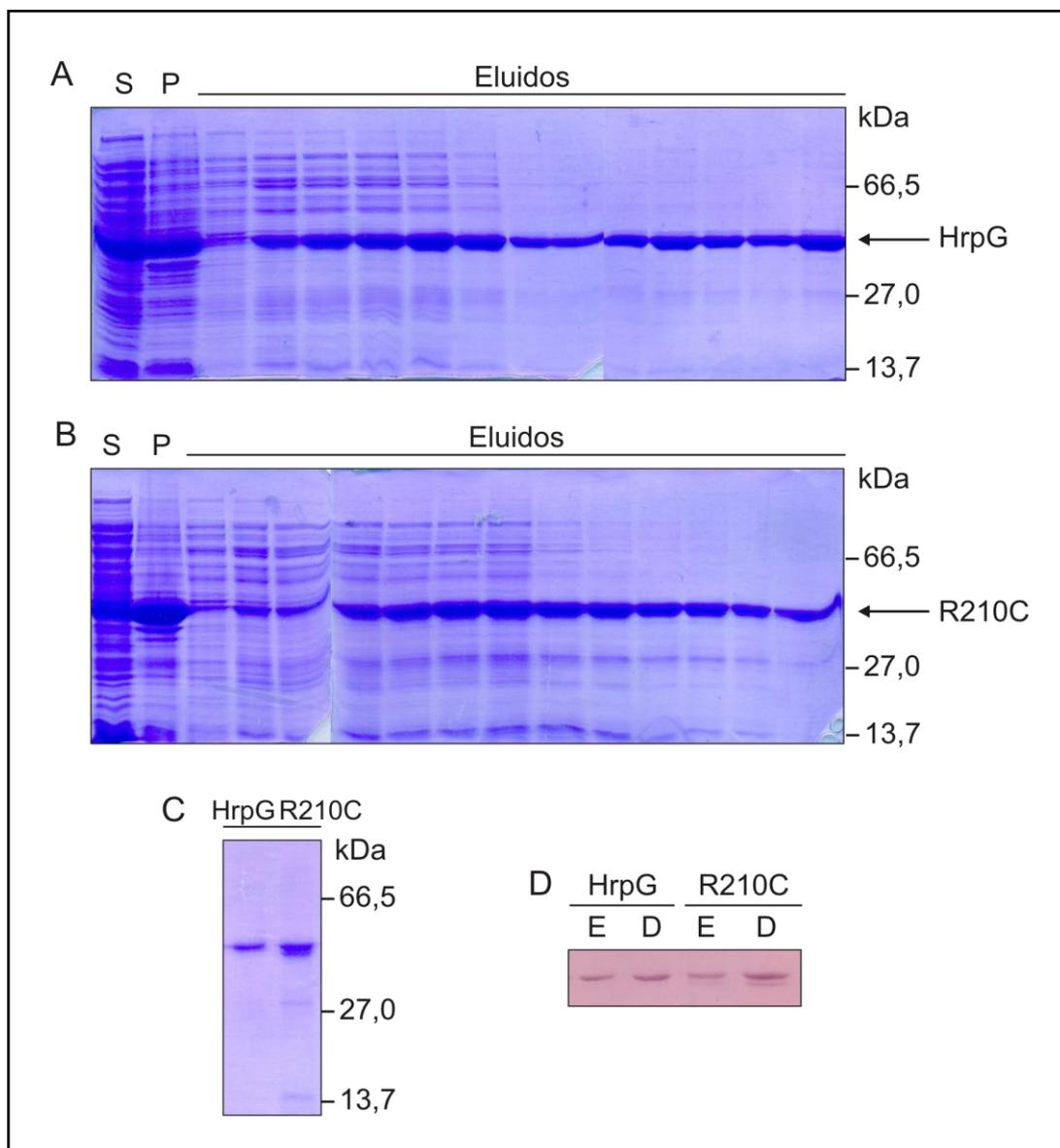


Figura 6.5. Purificación de las proteínas de fusión HrpG y R210C.

A y B: purificación de las proteínas HrpG (A) y R210C (B) fusionadas a 6HIS y Trx por cromatografía de afinidad a resina de agarosa Ni-NTA. S: fracción soluble y P: fracción del pellet celular luego del lisado del cultivo bacteriano; se muestran los eluidos 1 a 13 con 100 mM de imidazol (Eluidos). Geles de SDS-PAGE al 12 % teñidos con el colorante azul de coomassie, en cada calle se sembraron 10 μ l de cada muestra. A la derecha de cada gel se muestran algunas bandas del marcador de PM en kDa. Con las flechas se indican las bandas correspondientes a las proteínas purificadas. C: SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de coomassie donde se sembraron 5 μ l de las proteínas purificadas luego de la diálisis para determinar el rendimiento y concentración de las mismas. A la derecha se muestran los valores en kDa del marcador de PM. D: Western-blot con anticuerpos anti-HIS revelado por el método colorimétrico. Se sembraron muestras de las proteínas HrpG y R210C luego de la elución de la columna cromatográfica (E: eluidos) y luego de la diálisis (D: diálisis). Se sembraron 5 μ l de muestra por calle.

Se corroboró la purificación de las proteínas por detección en un western-blot con anticuerpos anti-HIS (figura 6.5D). Las fracciones proteicas de HrpG y R210C purificadas con la resina de afinidad se obtuvieron en una solución con Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM e imidazol 100 mM. A fin de eliminar el imidazol de las muestras y de reducir la fuerza iónica de las mismas para favorecer los ensayos de interacción con el ADN, las proteínas purificadas se dializaron en un volumen adecuado de Tris-HCl 50 mM pH 8 y NaCl 100 mM, en ausencia de imidazol y a 4 °C como se detalla en la sección 3.4.4 de Materiales y Métodos. Luego de la diálisis se verificó el rendimiento de las proteínas de fusión en geles de poliacrilamida desnaturizantes al 12 % que se tiñeron con azul de coomassie (figura 6.5C). La concentración de las proteínas luego de la diálisis se estimó mediante fotografías de los geles que se utilizaron para determinar y comparar por densitometría la intensidad de las bandas de las proteínas de interés y de un patrón de albúmina sérica bovina de concentración conocida (sección 3.19.2 de Materiales y Métodos). Las soluciones purificadas y dializadas de las proteínas de fusión se obtuvieron a una concentración promedio de 0,4 µg/µl para HrpG (equivalente a 9,7 µM) y de 0,3 µg/µl en el caso de R210C (equivalente a 6,4 µM).

Las muestras dializadas se guardaron a -70 °C hasta el momento de ser utilizadas en los ensayos de retardo en gel. Luego de realizar algunas pruebas de los ensayos de retardo, se observó que la estabilidad de las proteínas de fusión, principalmente de la proteína mutante R210C decaía durante el almacenamiento a -70 °C. Incluso, en ciertas ocasiones durante la diálisis se observó una leve turbidez en la muestra debido a una precipitación proteica. Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de estas muestras mostraron una leve degradación de la proteína mutante, que se evidenció por la presencia de bandas de menor peso molecular y en particular una banda de menor tamaño pero muy similar al de la proteína de fusión (figura 6.5C y 6.5D). Este comportamiento junto con las dificultades para expresar y purificar la proteína R210C en forma soluble, demuestran que la mutación no es favorable para la estabilidad de la proteína. Varios intentos de modificar las condiciones de expresión, purificación, diálisis y conservación de las proteínas, incluso a distintas temperaturas y con agregados de 10 a 25 % de glicerol, fueron infructuosos. Por ello, se continuó trabajando con las proteínas obtenidas de la manera descrita anteriormente, pero luego de la diálisis se mantuvieron a 4 °C por no más de 72 hs, luego de lo cual se descartaron y prepararon nuevas

muestras. De esta manera se optimizó la reproducibilidad de las purificaciones proteicas y de los ensayos de retardo en gel.

6.3.2-Obtención de las sondas promotoras marcadas radiactivamente

Las secuencias promotoras P_{hrpX} y P_{hrpG} identificadas y seleccionadas previamente, se utilizaron como sondas en los ensayos de retardo en gel de la movilidad electroforética. Para ello, ambos fragmentos se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de Xac con los pares de oligonucleótidos pHrpX up y pHrpX down, pHrpG up y pHrpG down, respectivamente (tabla 3.4 de Materiales y Métodos). Los productos amplificados se clonaron en el vector pBluescript II KS+ (tabla 3.3 de Materiales y Métodos), se verificaron por secuenciación y estas construcciones se utilizaron como molde en las reacciones de PCR para generar las sondas. La marca radiactiva de las sondas se incorporó mediante la fosforilación del extremo 5' de los oligonucleótidos reversos pHrpX down y pHrpG down con [γ -³²P]ATP, utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa. Estos oligonucleótidos marcados radiactivamente se usaron en las reacciones de PCR junto con la enzima ADN polimerasa Pfx50 y las construcciones en el vector pBluescript II KS+ para generar las sondas P_{hrpX} y P_{hrpG} marcadas (en la sección 3.17 de Materiales y Métodos se detallan las condiciones de marcación de los oligonucleótidos y de la reacción de PCR). Los productos de PCR se sembraron en geles de agarosa, se purificaron y cuantificaron mediante contador de centelleo para determinar la radiactividad incorporada en las sondas en cpm/ μ l y la concentración de ADN en μ g/ μ l se determinó por espectrofotometría.

6.3.3-Optimización de las condiciones de reacción para los ensayos de interacción ADN-proteína

La interacción entre las sondas de ADN y las proteínas HrpG y R210C se analizó mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética del ADN en geles de poliacrilamida nativos. Esta técnica consiste en la observación de complejos ADN-proteína que migran a través de geles de poliacrilamida más lentamente que las moléculas de ADN libre. Este método es utilizado ampliamente para el estudio de la unión de proteínas y factores de transcripción a secuencias específicas de ADN. En los ensayos de retardo se pueden distinguir dos etapas fundamentales: la reacción de unión, donde se incuban la proteína y la secuencia de ADN de interés; y la corrida electroforética para separar las

especies de ADN libre y acomplejado con la proteína a fin de visualizar el retardo en la movilidad. En general, las condiciones de unión y corrida electroforética específicas para cada par ADN-proteína deben ser optimizadas de forma empírica. Debido a que no se conocen reportes previos de ensayos de interacción entre proteínas HrpG de *Xanthomonas* con secuencias de ADN, se tomaron diversos protocolos de ensayos de retardo realizados con la proteína OmpR de *E. coli*, que se utilizaron como base para ensayar distintas condiciones de unión con las proteínas y sondas en estudio (Rampersaud y col., 1994; Huang e Igo, 1996; Yoshida y col., 2006; Rhee y col., 2008).

Las condiciones óptimas del ensayo de retardo se determinaron con la proteína HrpG fusionada a Trx y la sonda P_{hrpX} marcada radiactivamente con ³²P. En la tabla 6.2 se muestran algunas de las condiciones del medio de reacción que se ensayaron para detectar la interacción. Inicialmente, se utilizó una condición de referencia pero no se obtuvieron resultados positivos con la proteína HrpG sin dializar o dializada (columnas 1 y 2, tabla 6.2). A pesar de este resultado negativo se continuó trabajando con HrpG dializada, ya que posee menor fuerza iónica y no contiene imidazol que puede interferir en la interacción. Posteriormente, se modificaron las sales utilizadas como KCl, NaCl, CaCl₂ y MgCl₂, se modificó el contenido de glicerol, se adicionó un detergente no iónico como TWEEN® 20 y EDTA como agente quelante de iones, sin resultados favorables en todos los casos (columnas 3, 4, 5, 6 y 7, tabla 6.2). El agregado de DTT como agente reductor en la mezcla de reacción permitió la detección de una banda de retardo en los geles, correspondiente al complejo ADN-proteína (columnas 8 y 9, tabla 6.2). En las mismas condiciones pero utilizando la proteína no dializada no se detectó la banda de retardo, confirmando la interferencia del imidazol y la elevada concentración de NaCl presente en la muestra (columna 10, tabla 6.2). Finalmente, se modificó el pH y la concentración de la solución de Tris-HCl y de KCl (columnas 11, 12 y 13, tabla 6.2) obteniendo las mejores condiciones con Tris-HCl 5 mM pH 7, glicerol 5 %, KCl 25 mM, EDTA 2 mM y DTT 1 mM (columna 13, tabla 6.2), que se definieron como las condiciones óptimas para las reacciones de unión entre HrpG y P_{hrpX}.

Las reacciones de unión se incubaron entre 30 minutos y 1 hora, a 25 °C y 4 °C. Se ensayaron también dos condiciones diferentes en la corrida electroforética: geles de poliacrilamida nativos al 5 % en condiciones de baja fuerza iónica con buffer TBE (Tris-HCl, ácido bórico, EDTA); y geles de poliacrilamida al 4 % en condiciones de alta fuerza iónica

con buffer TGE (Tris-HCl, glicina, EDTA). Las mejores condiciones, se obtuvieron con los geles al 5 % en TBE incubando las reacciones durante 30 minutos a 25 °C.

Tabla 6.2. Condiciones de reacción ensayadas en los experimentos de retardo en gel.

MEDIO DE REACCION*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Tris-HCl 50 mM pH 7	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦			
Tris-HCl 50 mM pH 8											♦		
Tris-HCl 5 mM pH 7												♦	♦
Glicerol 5 %	♦	♦	♦	♦		♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
Glicerol 15 %					♦								
KCl 50 mM	♦	♦		♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	
KCl 25 mM													♦
CaCl ₂ 5 mM	♦	♦	♦		♦	♦							
NaCl 50 mM			♦										
MgCl ₂ 5 mM				♦									
EDTA 2 mM							♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
DTT 1 mM								♦		♦	♦	♦	♦
DTT 5 mM									♦				
Tween20 0.05 %						♦							
Sonda marcada 1000 cpm	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
HrpG no dializada 10 pmoles	♦									♦			
HrpG dializada 10 pmoles		♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦		♦	♦	♦
Resultado	×	✓	✓	×	✓	✓							

*En esta columna se detallan algunos componentes del medio de reacción que se probaron durante la optimización de los ensayos de retardo en gel.

Columnas 1 a 13: corresponden a distintas pruebas del medio de reacción, en cada columna se indica con ♦ la composición del medio y en la fila "Resultado" se indica con × un resultado negativo, con ✓ un resultado positivo, y con ✓✓ las condiciones óptimas.

6.3.4-HrpG y R210C interaccionan con las regiones promotoras de *hrpX* y *hrpG*

6.3.4.1-Ensayos de variación de la concentración de proteína

De acuerdo al modelo regulatorio propuesto para el cluster *hrp* de *Xanthomonas*, se comenzó estudiando la interacción de HrpG y la proteína mutante R210C con la región promotora del gen *hrpX*. Para ello, se realizaron ensayos de retardo en las condiciones óptimas determinadas previamente y se pudo observar una banda de retardo bien definida con ambas proteínas (figura 6.6A). Estos resultados sugieren que HrpG se une efectivamente al promotor de *hrpX*, para permitir la activación de su transcripción y que

la proteína mutante R210C mantiene la capacidad de unirse a las secuencias regulatorias del ADN al igual que la proteína salvaje, a pesar de poseer una mutación puntual en un residuo altamente conservado en la familia OmpR de reguladores transcripciones (Martínez-Hackert y Stock, 1997b).

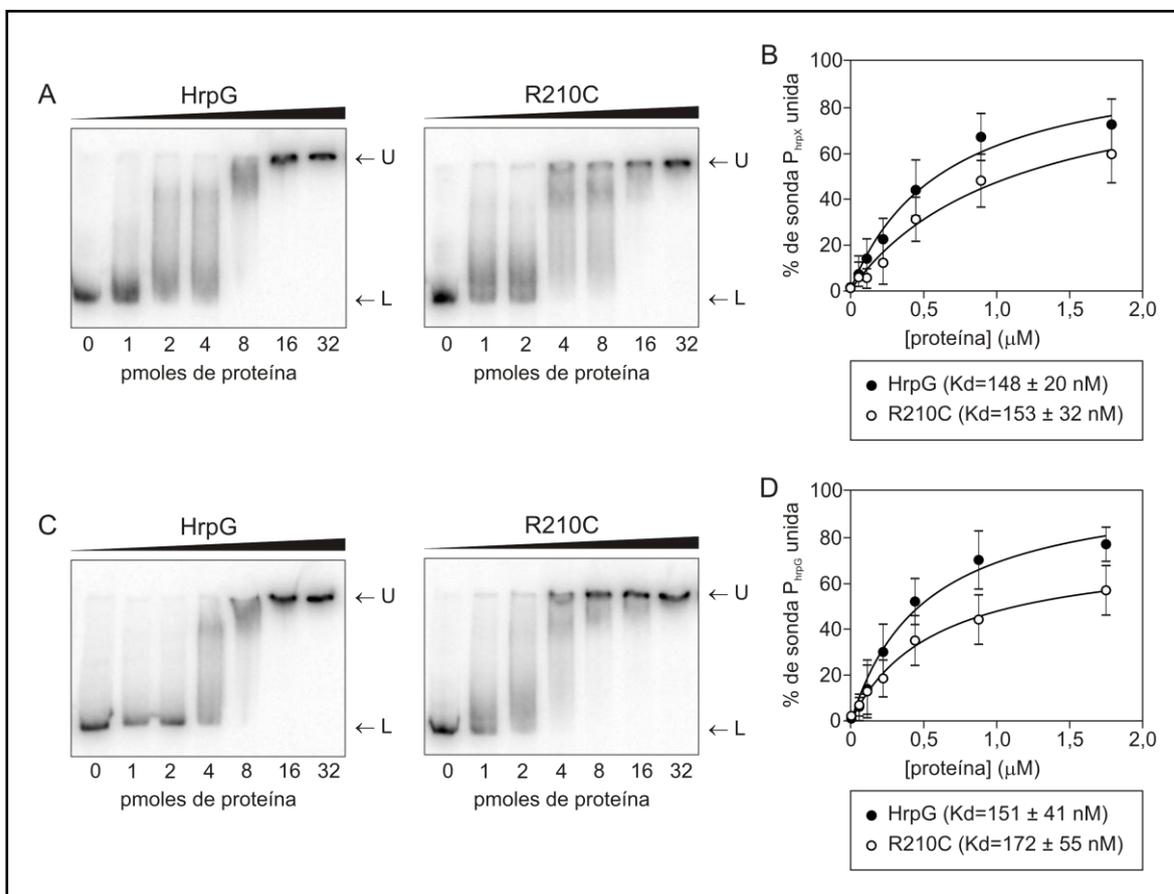


Figura 6.6. Interacción de HrpG y R210C con regiones promotoras del genoma de Xac.

A: ensayos de retardo en gel variando la concentración de proteína para comparar las afinidades de unión de HrpG (izquierda) y R210C (derecha) a la sonda marcada radiativamente P_{hrpX} . En las reacciones de unión se incubó 1 ng de sonda P_{hrpX} con 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 pmoles de HrpG y R210C, respectivamente. Se cuantificaron la sonda libre (L) y unida (U) a cada proteína y se determinaron los valores de K_d en base a tres experimentos independientes como se describe en Materiales y Métodos. B: gráfico del % de sonda P_{hrpX} unida a HrpG y R210C, respectivamente. C: ensayos de variación de la concentración de proteína realizados con la sonda radiactiva P_{hrpG} . Se incubó 1 ng de P_{hrpG} con 0, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 pmoles de HrpG (izquierda) y R210C (derecha), respectivamente. Se cuantificaron la sonda libre (L) y unida (U) a cada proteína y se determinaron los valores de K_d en base a tres experimentos independientes. D: gráfico del % de sonda P_{hrpG} unida a HrpG y R210C, respectivamente. En las referencias de los gráficos B y D se indican los valores de K_d para cada interacción. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar determinados para tres experimentos independientes.

La movilidad relativa (M_r), que se define como el cociente entre la distancia recorrida por el complejo ADN-proteína y la distancia recorrida por el ADN libre, es una

manera de expresar el retardo, y ambos parámetros varían de manera inversa. En el caso de los complejos HrpG-P_{hrpX} y R210C-P_{hrpX}, la Mr de ambos es similar y sin diferencias estadísticamente significativas, con un valor de $0,26 \pm 0,03$ y $0,27 \pm 0,02$, respectivamente. Esto sugiere que ambas proteínas interaccionarían con los mismos sitios regulatorios de la sonda y los complejos que forman son semejantes, por lo que no se visualizaron diferencias entre las bandas de retardo correspondiente a cada par ADN-proteína.

A fin de determinar si existen diferencias en la afinidad de la interacción entre HrpG y R210C y la sonda P_{hrpX}, se realizaron ensayos de retardo variando la concentración de las proteínas en las reacciones de unión entre 0 y 32 pmoles (equivalentes a 0 y 1,6 μ M) (figura 6.6A). En ambos casos, se observó un incremento en la banda de retardo al aumentar la cantidad de proteína, al mismo tiempo que disminuyó la intensidad de la banda correspondiente a la sonda P_{hrpX} libre. Con ambas proteínas, la banda correspondiente a la sonda libre comenzó a desplazarse con 1 pmol de proteína y el complejo ADN-proteína se visualizó con sucesivos agregados de proteína. Con el agregado de 32 pmoles se desplazó completamente la señal de la sonda libre a sonda unida con las respectivas proteínas. La afinidad de ambas proteínas por la sonda P_{hrpX} se expresó cuantitativamente mediante la confección de curvas de % de sonda unida en función de la concentración de proteína agregada a la mezcla de reacción y para cada interacción se determinó la Kd como se detalla en la sección 3.17.5 de Materiales y Métodos (figura 6.6B). Las Kd determinadas para las interacciones HrpG-P_{hrpX} y R210C-P_{hrpX} fueron similares, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas, con valores de 148 ± 20 nM y 153 ± 32 nM, respectivamente. Estos resultados sugieren que HrpG y R210C interaccionan fuertemente con la región promotora del gen *hrpX* y que a pesar de la mutación presente en R210C, la afinidad de ambas proteínas con la sonda no se vio alterada.

A fin de determinar la interacción de HrpG con su propio promotor se realizaron ensayos de retardo con la sonda P_{hrpG}. En las mismas condiciones de reacción utilizadas con la sonda P_{hrpX} se observaron bandas de retardo correspondientes a los complejos HrpG-P_{hrpG} y R210C-P_{hrpG} (figura 6.6C). Estos resultados sugieren que HrpG es capaz de reconocer y unirse a secuencias específicas en su propio promotor. Mediante los ensayos de retardo variando la concentración de proteína en las mezclas de reacción se determinaron las Kd para ambos complejos con la sonda P_{hrpG} que fueron similares para

ambas proteínas (HrpG: 151 ± 41 nM, R210C: 172 ± 55 nM) y no mostraron diferencias estadísticamente significativas (figura 6.6D). Los geles de retardo mostraron un patrón de bandas similar que en el caso de la sonda P_{hrpX} (figura 6.6A y B). Los valores de K_d obtenidos para ambas regiones promotoras (P_{hrpX} y P_{hrpG}) son similares, indicando igual afinidad del regulador salvaje y mutante por las secuencias de ADN. En conjunto, los resultados muestran que HrpG y el regulador mutante R210C pueden unirse a las secuencias regulatorias de los promotores de los genes *hrpX* y *hrpG* con una afinidad similar.

6.3.4.2-Ensayos de competencia

Debido a que los extractos proteicos utilizados en los ensayos de retardo no contenían las proteínas totalmente libre de impurezas y que se utilizaron las proteínas recombinantes fusionadas a Trx, se verificó la especificidad de la interacción de HrpG y R210C con las sondas promotoras mediante ensayos de retardo con la proteína Trx. Para ello, se purificó la proteína a partir del vector pET32-am en las mismas condiciones que las proteínas de fusión y luego de la diálisis se adicionó a las mezclas de reacción con las sondas P_{hrpX} y P_{hrpG} , respectivamente. En la figura 6.7A se observa que Trx no es capaz de interactuar con la sonda P_{hrpX} . Incluso con el doble de Trx respecto a la cantidad utilizada de las proteínas en estudio no se observó interacción (datos no mostrados) y con la sonda P_{hrpG} se obtuvieron iguales resultados aunque no se muestran en la figura. De esta manera se confirmó que las interacciones observadas entre las proteínas de fusión y los promotores de los genes *hrpX* y *hrpG* son específicas y que la fusión a Trx no interfiere en los ensayos.

A fin de determinar que las proteínas se unen específicamente a las regiones promotoras de los genes *hrpX* y *hrpG*, se realizaron ensayos de competencia específica e inespecífica con ADN. En la competencia inespecífica las reacciones de unión se realizan en presencia de fragmentos de ADN que no contienen las secuencias específicas de las sondas, como ADN de esperma de salmón o poli dI-dC. En el caso de HrpG y R210C, un exceso de 200 veces de ADN inespecífico respecto de cada sonda marcada produjo una leve alteración en la intensidad aunque no fue capaz de desplazar las bandas de retardo (figura 6.7A, muestra los ensayos con la sonda P_{hrpX} y con la proteína HrpG, con la proteína R210C y con la sonda P_{hrpG} se obtuvieron resultados similares aunque no se muestran en la figura). En la competencia específica se utilizan concentraciones

proteína HrpG (figura 6.7B). En el caso de la proteína mutante R210C la disminución en la intensidad de la banda de retardo comienza a apreciarse con un exceso de 25 veces de ADN frío (figura 6.7C) y en ambos casos la sonda unida a las respectivas proteínas desaparece casi por completo con un exceso de 200 veces. En la interacción con el promotor del gen *hrpG*, los complejos con HrpG y R210C disminuyen en su intensidad con un exceso de 25 veces, y la banda desaparece por completo con un exceso de ADN frío de 100 veces (figura 6.7D y E). Estos resultados indican que las sondas frías desplazan a las sondas marcadas radiactivamente de su unión con las proteínas HrpG y R210C; lo que sugiere que la interacción con las secuencias nucleotídicas de las regiones promotoras de los genes *hrpX* y *hrpG* es específica.

6.4-Identificación de dominios conservados en HrpG de *X. axonopodis* pv. *citri*

6.4.1-Modelado estructural de HrpG

La proteína reguladora HrpG del SSTT de Xac, pertenece a la superfamilia de reguladores transcripcionales del tipo OmpR/PhoB por la similitud estructural del dominio de unión al ADN (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). A fin de visualizar la estructura de HrpG, comprender su función regulatoria y los resultados obtenidos mediante los ensayos de retardo en gel, se realizó un modelado estructural mediante el programa SwissModel-SPDViewer (sección 3.18 de Materiales y Métodos). Inicialmente, se hizo una búsqueda de proteínas homólogas a HrpG cuyas estructuras tridimensionales son conocidas, ya sea por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Se eligió la proteína de mayor homología que resultó ser RegX3 un regulador del sistema de dos componentes SenX3-RegX3 de *Mycobacterium tuberculosis* (número de acceso en PDB: 2oqrA, Parish y col., 2003; King-Scott y col., 2007). La mayoría de los miembros de la familia OmpR son reguladores de respuesta que forman parte de sistemas transductores de señal de dos componentes, con un dominio regulatorio N-terminal y un dominio de unión a ADN en el extremo C-terminal de la proteína. Solo un pequeño grupo de reguladores de esta familia, como ToxR de *Vibrio cholerae* y CadC de *E. coli* son proteínas asociadas a membrana (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). En la figura 6.8 se muestra el modelado estructural de HrpG que es una proteína multidominio con tres regiones bien definidas: los dominios N-terminal y C-terminal y una región intermedia denominada "linker" (vinculador). El extremo N-terminal de HrpG corresponde al dominio receptor de respuesta con

homología al regulador quimiotáctico CheY. Este dominio contiene un sitio altamente conservado de fosforilación en un residuo de ácido aspártico que podría ser fosforilado mediante una histidina quinasa sensora. También constituye el dominio de dimerización y posee aminoácidos conservados que presentan homología estructural con el regulador CheY (Wengelnik y col., 1996b; Hong y col., 2007). El “linker” es una región de longitud variable, flexible, y por lo tanto poco resuelta en estructuras tridimensionales, sensible a proteólisis y que podría adoptar distintos cambios conformacionales permitiendo la comunicación entre los dominios *N*-terminal y *C*-terminal para la activación de la proteína (figura 6.8) (Kenney y col., 1995; Kenney, 2002).

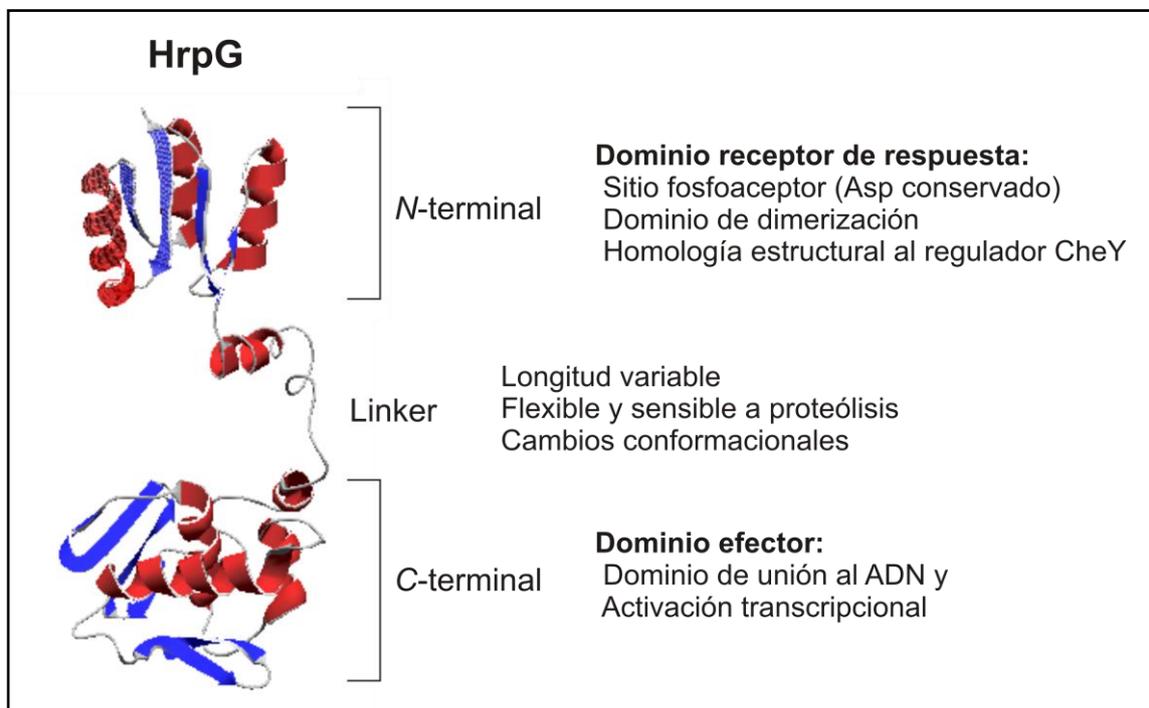


Figura 6.8. Modelado estructural de HrpG de Xac.

Se muestra un modelado de la estructura tridimensional de la proteína HrpG completa obtenido mediante el programa SwissModel-SPDViewer. Como molde se utilizó la estructura conocida del regulador RegX3 de *M. tuberculosis* que mostró mayor homología con HrpG. El texto de la figura señala las tres regiones principales de la proteína con las funciones y características más importantes de las mismas. En rojo se muestran las estructuras secundarias de tipo α -hélice, en azul las láminas β y en gris los giros o turns.

El dominio *C*-terminal de HrpG o dominio efector, tiene homología a factores de transcripción del tipo hélice-giro-hélice (HTH, del inglés helix-turn-helix) denominados HTH doble alados (wHTH, del inglés winged: alado) que se caracterizan por tener uno o dos motivos de láminas β (las “alas”) flanqueando el motivo HTH (Kenney, 2002; Aravind y

col., 2005). Las funciones principales de este dominio consisten en la unión de secuencias regulatorias en el ADN y la activación de la transcripción génica mediante interacciones con la ARN polimerasa (Martínez-Hackert y Stock, 1997b).

6.4.2-Modelado estructural del extremo C-terminal de HrpG

OmpR de *E. coli*, es uno de los miembros más estudiados de la familia de reguladores de respuesta OmpR/PhoB. Junto con la histidina quinasa EnvZ, forma parte de un sistema de dos componentes que regula principalmente la expresión de las porinas de membrana externa OmpC y OmpF en respuesta a la osmolaridad del medio en el que se encuentre la bacteria. A baja osmolaridad predomina la porina OmpF, pero a alta osmolaridad *ompF* es reprimido y la porina mayoritaria en la membrana externa es OmpC (van Alphen y Lugtenberg, 1977). Recientemente surgieron evidencias de que OmpR tendría además un rol central en la regulación de genes housekeeping y de virulencia en numerosos organismos (Lee y col., 2000; Brzostek y col., 2003). La estructura tridimensional de la región C-terminal de OmpR ha sido determinada por cristalografía de rayos X y RMN (Kondo y col., 1997; Martínez-Hackert y Stock, 1997a; Rhee y col., 2008), proporcionando información estructural de valiosa utilidad para analizar las características conservadas en esta familia de reguladores. A fin de caracterizar en profundidad el dominio de unión a ADN de HrpG, se alineó su secuencia aminoacídica con la de la proteína OmpR de *E. coli* (NP_417864.1). Mediante la herramienta bioinformática BLAST (sección 3.18 de Materiales y Métodos), se observó homología entre 94 aminoácidos del dominio C-terminal de HrpG (HrpGc) y 93 aminoácidos del extremo C-terminal de OmpR (OmpRc). El alineamiento entre HrpGc y OmpRc arrojó un 25% de identidad entre las secuencias aminoacídicas (figura 6.9). En general, dentro de la familia la identidad entre sus miembros es entre 20 % y 60 %. Esta baja homología de secuencias es posible debido a que cada proteína de la familia está involucrada en interacciones específicas para reconocer una secuencia de ADN particular y según el regulador, pueden interactuar con la subunidad α CTD o $\sigma 70$ de la ARN polimerasa para activar la transcripción génica (Martínez-Hackert y Stock, 1997b; Kenney, 2002). Por este motivo también es difícil determinar los sitios de reconocimiento de estas proteínas. En general, los sitios consisten en repeticiones directas, aunque existen excepciones respecto al número de sitios y la distancia entre ellos. Además, algunos miembros de la familia

funcionan como activadores y represores, mientras que otros, como PhoB, sólo son activadores (Martínez-Hackert y Stock, 1997b).

HrpGc	(139)	LSVGPYRLIRDENTVYLDGKPIVLTAREFSIAWLLFSSPGVCFRRQCQL	(186)
		++ G ++L ++ + +P+ LT+ EF++ L S P R +L	
OmpRc	(138)	IAFGKFKNLGTREMFREDEPMLPLTSGEFAVLKALVSHPREPLSRDKL	(185)
HrpGc	(187)	AKAVWGSHTTEFTDRTMEQHIYKLRKKLQLSSDSSAVR-IRTVYSHGY	(232)
		G +R+++ I +LR+ ++ D + R I+TV+ GY	
OmpRc	(186)	MNLARGREYSAMERSIDVQISRLRRMVE--EDPAHPRYIQTVWGLGY	(230)

Figura 6.9. Alineamiento de secuencias del extremo C-terminal de las proteínas HrpG de Xac y OmpR de *E. coli*.

El apilamiento se realizó mediante BLAST. Se muestra la región C-terminal de HrpG desde el aminoácido 139 al 232, de los 263 aminoácidos totales que posee. De OmpR se muestran los aminoácidos 138 al 230, de los 239 aminoácidos que contiene la proteína completa. En rosa se resalta el residuo de arginina (R) que está mutado por una cisteína en la proteína R210C de Xac. Identidad entre las secuencias 25 %. Las letras entre las secuencias indican los aminoácidos idénticos y el signo + indica sustituciones homólogas de aminoácidos entre las secuencias alineadas.

Luego de analizar la homología entre los dominios C-terminales de las proteínas, se modeló la estructura tridimensional de HrpGc utilizando como modelo la estructura resuelta por RMN de OmpRc de *E. coli* (número de acceso en PDB: 2jpb, Rhee y col., 2008). En el modelado obtenido (figura 6.10) se puede observar que el dominio de unión al ADN de HrpG está conformado por un extremo N-terminal compuesto de una lámina β de cuatro hebras antiparalelas (β 1, β 2, β 3 y β 4). En la región central se encuentran tres hélices α , de las cuales la hélice α 2, el bucle α (o α -loop, en inglés) y la hélice α 3 conforman el motivo HTH. Dentro del motivo HTH, la hélice α 2 es la hélice de posicionamiento, α 3 la hélice de reconocimiento de las secuencias de ADN específicas y el bucle α haría contacto con la subunidad α CTD de la ARN polimerasa para activar la transcripción génica (Kondo y col., 1997; Martínez-Hackert y Stock, 1997a; Kenney, 2002; Rhee y col., 2008). El extremo C-terminal de este dominio está formado por un β hairpin (horquilla). Las “alas” características de este tipo de factores de transcripción del tipo HTH están definidas por las hebras β 5 y β 6, en el caso del ala 1 (W1, del inglés wing: ala) y la hebra β 4 y la hélice α 1 definen el ala 2 (W2) (Martínez-Hackert y Stock, 1997a; Martínez-Hackert y Stock, 1997b) (figura 6.10). Dentro de la superfamilia wHTH de reguladores, el bucle α y las 4 hebras β del extremo N-terminal son exclusivas y características de la familia OmpR y no están presentes en otras proteínas wHTH (Martínez-Hackert y Stock,

1997b; Kenney, 2002; Aravind y col., 2005). El bucle α del motivo HTH es inusualmente largo en OmpR con una longitud de 10 aminoácidos comparado con 3 o 4 aminoácidos que es la longitud normal en otras proteínas y es una de las regiones menos conservadas a nivel de la secuencia primaria dentro de la familia (Kondo y col., 1997; Martínez-Hackert y Stock, 1997a). En HrpG el bucle α tiene una longitud de 7 aminoácidos, es decir, es más corto que en OmpR pero es largo comparado con la longitud normal de esta estructura. Se ha denominado bucle α porque se sugiere que interacciona con la subunidad α CTD de la ARN polimerasa, ya que ciertas mutaciones en OmpR que son incapaces de activar la transcripción poseen mutaciones en esta región (Kenney y col., 1995; Martínez-Hackert y Stock, 1997b). Sin embargo, todavía no se ha demostrado la interacción con α CTD y ciertas evidencias sugieren que también estaría involucrado en la unión al ADN (Gajiwala y Burley, 2000; Kenney, 2002).

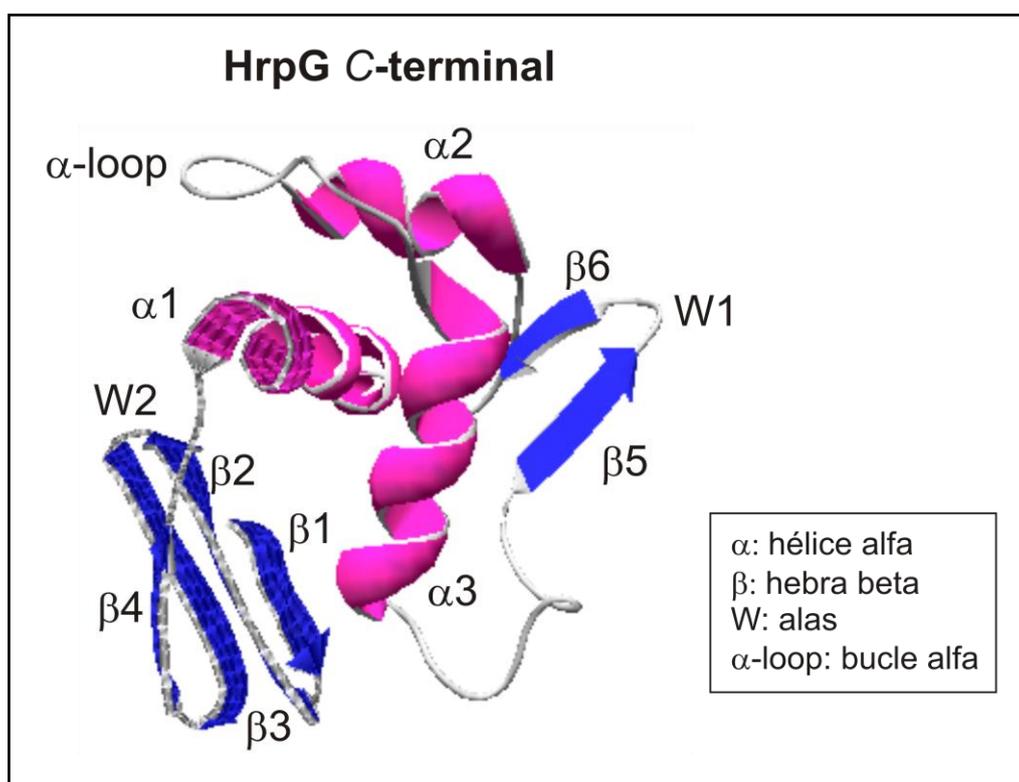


Figura 6.10. Modelado estructural del dominio de unión al ADN de HrpG.

Modelado de la estructura tridimensional del dominio C-terminal de unión al ADN de la proteína HrpG de *Xac* obtenido mediante el programa SwissModel-SPDViewer. El modelado se realizó mediante el alineamiento de HrpGc con 20 estructuras de OmpR de *E. coli* obtenidas mediante RMN (número de acceso en PDB: 2jpb). En rosa se muestran las estructuras secundarias de tipo α -hélice, en azul las láminas β y en gris los giros o turns. El recuadro muestra la referencia de los símbolos utilizados para señalar las distintas estructuras secundarias del modelado. α : hélice alfa, β : hebra o lámina beta, W: alas o "wings", α -loop: bucle alfa o bucle α .

En OmpR se define una región de 98-100 aminoácidos dentro del dominio C-terminal que forman el núcleo o core hidrofóbico del dominio de unión al ADN. Los residuos que forman el core hidrofóbico son aportados por todos los elementos de estructura secundaria y son los más conservados dentro de la familia OmpR debido a que el empaquetamiento de los mismos es importante para estabilizar la conformación nativa de las proteínas. La conservación de estos residuos es evidencia de que los miembros de una familia comparten una conformación común (Martínez-Hackert y Stock, 1997b; Kenney, 2002).

6.4.3-Modelo de unión al ADN de HrpG y el rol del residuo de arginina 210

Originalmente se asumió que todas las proteínas wHTH se unían de igual modo al ADN. Sin embargo, las proteínas wHTH muestran una marcada versatilidad respecto a cómo las alas (W1 y W2) se unen al ADN. Las primeras estructuras determinadas para proteínas de la familia co-cristalizadas con ADN, mostraban que las alas hacían contacto con el esqueleto fosfatídico del ADN y la hélice de reconocimiento $\alpha 3$ estaba ubicada en el surco mayor del ADN. Por el contrario, algunas proteínas utilizan el ala W1 para hacer contacto con el surco mayor del ADN y en otros casos se vio a la hélice $\alpha 3$ en una orientación tangencial a diferencia de la orientación perpendicular más común, respecto del surco mayor del ADN (Gajiwala y Burley, 2000; Kenney, 2002). Hasta el momento no se ha podido co-cristalizar OmpRc unida a secuencias de ADN para determinar el modo en que se une a las secuencias regulatorias, sin embargo mediante estudios de RMN y comparación con otras proteínas de la familia se propuso que en OmpRc la hélice de reconocimiento $\alpha 3$ se posiciona perpendicular al surco mayor del ADN y las alas interactúan con los surcos menores adyacentes al surco mayor que acomoda la hélice de reconocimiento (figura 6.11A) (Rhee y col., 2008).

En la hélice $\alpha 3$ y el ala W1 se encuentran los aminoácidos más conservados que son críticos para determinar la especificidad de unión (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). En OmpR y PhoB muchos de los aminoácidos en la hélice de reconocimiento son idénticos o son sustituciones conservadas, a pesar de que estas proteínas reconocen secuencias de ADN diferentes (Kenney, 2002). La hélice de reconocimiento $\alpha 3$ es inusualmente larga y sus extremos están implicados en el contacto con el ADN ya que mutaciones en esa región de OmpR afectan el fenotipo de las porinas (Mizuno y col., 1988; Aiba y col., 1994; Kato y col., 1995).

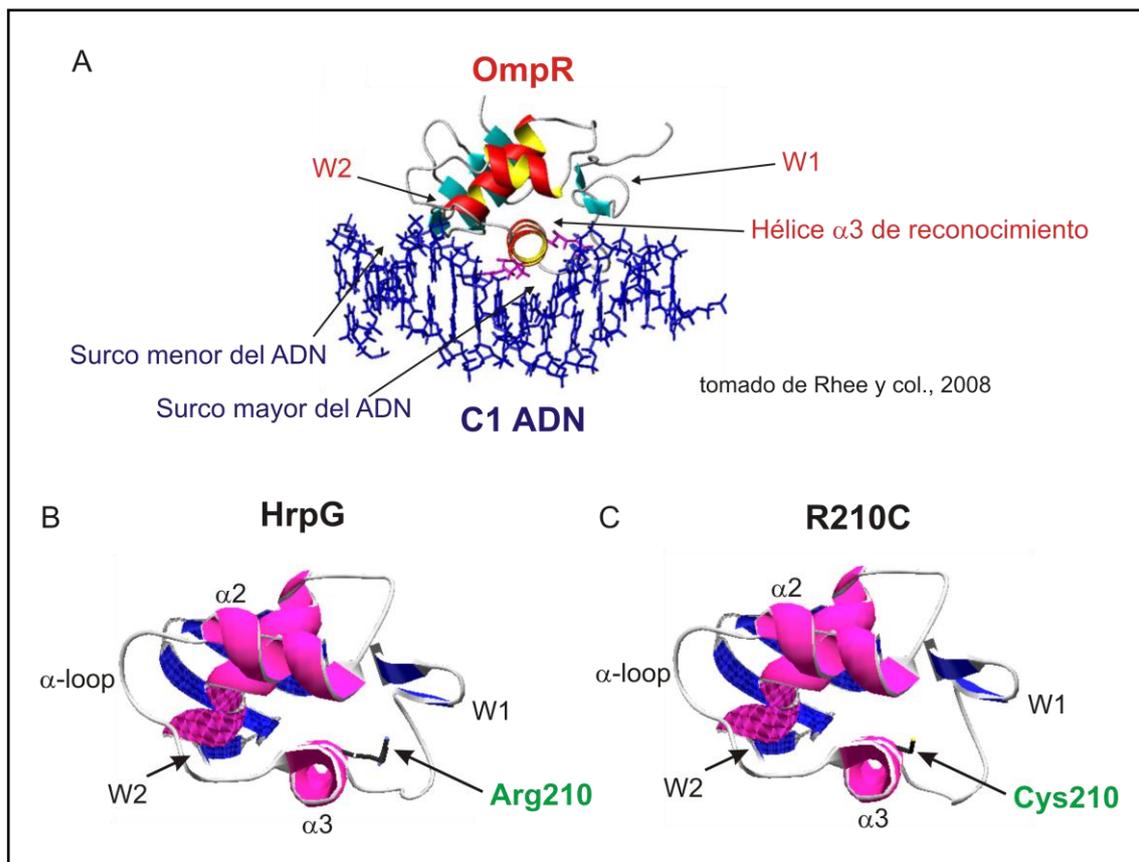


Figura 6.11. Posicionamiento del dominio de unión al ADN de los reguladores de la familia OmpR al interactuar con sus secuencias específicas de reconocimiento.

A: modelado de OmpRc unido al sitio de reconocimiento C1 del ADN, tomado de Rhee y col., 2008. Se señalan las alas (W1 y W2) y la hélice $\alpha 3$ de reconocimiento (rojo); en el ADN se indican el surco mayor y menor (azul) donde se acomodan las estructuras mencionadas del dominio C-terminal de OmpR. En rojo se muestran las estructuras secundarias de tipo α -hélice, en celeste las láminas β , en gris los giros o turns y en azul la molécula de ADN. B, C: Estructuras tridimensionales de los dominios C-terminales de HrpG y R210C de Xac. Ambas estructuras se muestran en una orientación espacial similar a la adoptada por OmpR al interactuar con el ADN (A). Las figuras B y C permiten comparar las estructuras de la proteína salvaje HrpG y la mutante R210C de Xac y visualizar la similitud con la conformación de OmpR al unirse al ADN. En rosa se muestran las estructuras secundarias de tipo α -hélice, en azul las láminas β y en gris los giros o turns. En negro se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos arginina (Arg210) y cisteína (Cys210). W1 y W2: alas 1 y 2, respectivamente; $\alpha 2$ y $\alpha 3$: hélices α ; α -loop: bucle alfa.

La arginina 210 de HrpG de Xac, se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína, específicamente en el dominio de unión al ADN (ver figura 5.2, Capítulo II). La comparación de secuencias de HrpG con proteínas homólogas de otras Xanthomonas y con reguladores de la familia OmpR/PhoB, mostró una alta conservación de este residuo (figura 5.2, Capítulo II). La Arg²¹⁰ de HrpG es homóloga a la Arg²⁰⁹ de OmpR y es uno de los pocos residuos invariables dentro de la familia (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). Al igual

que en OmpR, la Arg²¹⁰ de HrpG se posiciona en la hélice $\alpha 3$ de reconocimiento del motivo HTH, y a pesar de estar altamente conservada no forma parte del core hidrofóbico. En OmpR se vio que la Arg²⁰⁹ hace contacto con el esqueleto fosfatídico del ADN, mientras que los residuos Val²⁰³ y Arg²⁰⁷ harían contacto con las bases de timina y guanina de la secuencia de reconocimiento, respectivamente (Rhee y col., 2008). En el regulador mutante R210C de Xac la Arg²¹⁰ está sustituida por una cisteína. En OmpR se vio que mutaciones en la Arg²⁰⁹ afectan su correcto funcionamiento, sustituciones por alanina reducen la actividad casi al nivel de una cepa nula en OmpR (Rhee y col., 2008). En la figura 6.11B se muestra el modelado de la región C-terminal de la proteína HrpG pero en una orientación espacial similar a la que adopta OmpRc de *E. coli* cuando interactúa con el ADN y se señala el residuo Arg²¹⁰ que se encuentra en la hélice $\alpha 3$ de reconocimiento. En la figura 6.11C se muestra un modelado de la región C-terminal de la proteína mutante R210C obtenido de igual manera que el modelado de HrpGc. En la estructura de R210C se puede apreciar que la mutación del residuo de arginina por el de cisteína no produciría grandes alteraciones en la estructura secundaria y terciaria de la proteína. Esto sugiere que a pesar de poseer residuos de aminoácidos distintos, la estructura global puede no estar alterada permitiendo la correcta interacción con las secuencias regulatorias del ADN, lo que explicaría los resultados obtenidos en los ensayos de interacción ADN-proteína en los experimentos de retardo en gel. Sin embargo, un análisis más profundo del aminoácido mutado y las posibles interacciones con otros residuos, muestran que a pesar de que R210C puede unirse a las secuencias regulatorias del ADN reconocidas por HrpG, la presencia de la cisteína puede afectar interacciones críticas con otros aminoácidos que pueden ser claves para la activación de la transcripción génica (ver en la discusión).

6.5-Discusión

Las proteínas reguladoras de respuesta se clasifican en tres subfamilias mayoritarias de acuerdo a la homología entre los dominios de unión al ADN: la subfamilia OmpR/PhoB con dominios hélice-giro-hélice doble alados (wHTH) (Martínez-Hackert y Stock, 1997a, Kondo y col., 1997), la subfamilia NarL/FixJ con un dominio de 4 hélices (Baikalov y col., 1996; Baikalov y col., 1998), y la subfamilia NtrC/DctD de factores de transcripción acoplados a ATPasas (Aravind y col., 2005; Galperin, 2006). Otras proteínas reguladoras de respuesta poseen dominios de unión al ADN diferentes o contienen dominios efectores como aquellos con actividades enzimáticas, unión a ARNs, unión a proteínas o ligandos (Galperin, 2006). Las proteínas HrpG de *Xanthomonas* pertenecen a la subfamilia OmpR/PhoB por su homología en el dominio de unión al ADN. A pesar de los numerosos estudios realizados mediante fusiones transcripcionales, mutagénesis en HrpG y estudios de microarreglos que muestran las funciones y procesos celulares en los que estaría involucrada esta proteína (Wengelnik y col., 1996b; Wengelnik y col., 1999; Guo y col., 2011), no existen evidencias directas de que HrpG es capaz de reconocer y unirse a las secuencias promotoras de los genes que regula. Por ello, se decidió caracterizar en profundidad la función de HrpG como regulador transcripcional. En *Xac* y otras *Xanthomonas* los genes *hrpG* y *hrpX* están localizados en una región del genoma fuera del cluster *hrp* pero próximos entre sí y se transcriben a partir de regiones promotoras divergentes. El modelo regulatorio propuesto en *Xcv* (Wengelnik y col., 1996b) sugiere que HrpG regularía positiva y negativamente los genes *hrpX* y *hrpG*, respectivamente (figura 6.1); por lo que la región intergénica de estos genes se dividió en dos regiones promotoras para analizar la presencia de elementos regulatorios. El análisis *in silico* de estas regiones y los experimentos realizados mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *gfp*; demostraron que P_{hrpX} y P_{hrpG} contienen elementos regulatorios *in cis* funcionales que pueden ser reconocidos por la ARN polimerasa y factores de transcripción que activan la transcripción génica. Junto con los resultados de los análisis transcripcionales obtenidos mediante RT-PCR (Capítulo II), los resultados de las fusiones al gen reportero *gfp*, indicarían que el modelo regulatorio propuesto para el cluster *hrp* de *Xcv*, también es válido en *Xac* y probablemente en todas las especies del género *Xanthomonas*, donde HrpG activa la transcripción de *hrpX* al mismo tiempo que reprime su propia transcripción.

A fin de determinar si HrpG es capaz de unirse a las secuencias regulatorias P_{hrpX} y P_{hrpG} , se realizaron ensayos de retardo en la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. La proteína mutante R210C se incluyó en los ensayos con el objetivo de asignar un rol al residuo Arg²¹⁰ y con el fin de comprender los fenotipos observados con las cepas que expresan el regulador mutante. Los experimentos de unión de HrpG a las secuencias promotoras P_{hrpG} y P_{hrpX} muestran que la proteína es capaz de unirse a secuencias regulatorias del genoma de Xac, confirmando su rol como regulador transcripcional. La proteína mutante R210C también fue capaz de unirse a las mismas secuencias de ADN, indicando que los fenotipos observados en las cepas que contienen el regulador mutante R210C (Capítulo II), no se deberían a una incapacidad de reconocer y unir secuencias regulatorias, sino que, por ejemplo en XacR210C, la proteína mutante se une y compete por los mismos sitios regulatorios en la secuencia de ADN que son reconocidos por la proteína salvaje HrpG. Las constantes de equilibrio (Kd) estimadas para la unión de HrpG y R210C a las sondas P_{hrpX} y P_{hrpG} son similares y no muestran diferencias estadísticamente significativas, corroborando la capacidad de unirse específicamente a las mismas secuencias y con una afinidad similar. En la mutante R210C podría suceder lo mismo que en ciertas mutantes de OmpR que retienen la capacidad de unirse al ADN pero no pueden activar la transcripción génica (Russo y col., 1993; Kato y col., 1995). Algunas mutaciones que ocurren en el bucle α de OmpR, y mutaciones puntuales en la subunidad α CTD de la ARN polimerasa tienen el mismo efecto sobre la expresión de las porinas (Garret y Silhavy, 1987; Slauch y col., 1991; Sharif e Igo, 1993), sugiriendo que OmpR activa la transcripción mediante interacciones con la subunidad α CTD y no con $\sigma 70$ de la ARN polimerasa (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). Las dificultades observadas durante la purificación y conservación de la proteína R210C sugieren cierto grado de inestabilidad conformacional que no se ve traducido en la unión *in vitro* a las secuencias de ADN, pero *in vivo* podría afectar drásticamente el correcto funcionamiento de la proteína, como su interacción con la ARN polimerasa.

El modelado estructural de HrpG muestra la conservación de estructuras y motivos con reguladores de la familia OmpR sugiriendo un funcionamiento similar. Por otro lado, el modelado de R210C no muestra alteraciones en la estructura secundaria o terciaria de la proteína, indicando que puede interactuar normalmente con las secuencias regulatorias de ADN. Cabe destacar que Swiss-Model es un servidor que realiza modelados teóricos de la estructura tridimensional de las proteínas y por lo tanto no son

estructuras que surgen de datos experimentales; por lo que a pesar de ser una herramienta valiosa para identificar y visualizar los dominios y motivos característicos de la familia de reguladores OmpR en las proteínas en estudio, los modelados pueden contener errores y no deben ser tomados como estructuras verdaderas (Arnold y col., 2006; Kiefer y col., 2009; Peitsch, 1995; Schwede y col., 2003; Guex y Peitsch, 1997).

La hélice de reconocimiento $\alpha 3$ de la proteína OmpR es anfipática, y entre los residuos de aminoácidos que están expuestos en la superficie se incluyen Ser²⁰⁰, Asp²⁰², Val²⁰³, Ser²⁰⁶, Arg²⁰⁷ y Arg²¹⁰; mientras que los residuos Gln²⁰⁴, Arg²⁰⁹ y Met²¹¹ están parcialmente expuestos al solvente. Los residuos Val²⁰³ y Arg²⁰⁷ que tienen contacto directo con las bases del ADN, son variables dentro de la familia OmpR (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). Todos los residuos que están altamente conservados en la familia OmpR se localizan cerca de la hélice de reconocimiento, las interacciones entre ellos estarían conservadas y estarían involucrados en interacciones que ensamblan correctamente a las alas (W1 y W2) con la hélice $\alpha 3$. Por ejemplo, en la estructura de OmpR se determinó que la Thr¹⁶² forma parte del ala W2 y el Glu¹⁶⁵ está adyacente al N-terminal de la hélice $\alpha 1$. Ambos residuos unen el ala W2 con la hélice $\alpha 3$ de reconocimiento a través de enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas (Kondo y col., 1997; Martínez-Hackert y Stock, 1997a). Leu²⁰⁸ y Arg²⁰⁹ están en el C-terminal de la hélice $\alpha 3$ de reconocimiento. Los residuos Thr²²⁴, Gly²²⁹ y Tyr²³⁰ forman parte del C-terminal del ala W1. W1 está unida a la hélice $\alpha 3$ a través de enlaces de hidrógeno entre los residuos de Arg²⁰⁹, Ile²²² y Thr²²⁴. El oxígeno principal de Ile²²² interacciona con 2 átomos de nitrógeno de Arg²⁰⁹ (N ϵ y N $\eta 2$). El N $\eta 2$ de Arg²⁰⁹ también forma un enlace de hidrógeno con el O γ de Thr²²⁴ (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). Este conjunto de interacciones estarían en todos los homólogos de OmpR, ya que el aminoácido correspondiente a Arg²⁰⁹ de OmpR está enteramente conservado en la familia OmpR; y Thr²²⁴ está altamente conservado como treonina o serina y alanina (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). Arg²⁰⁹ y Thr²²⁴ están cerca de 2 residuos conservados que forman parte del ala W1, Gly²²⁹ y Tyr²³⁰. Gly²²⁹ se encuentra en todos los homólogos de OmpR y junto con Val²²⁵ y Leu²²⁸ forman un β -bulge antiparalelo clásico (protuberancia β) (Chan y col., 1993). Val²²⁵ forma dos enlaces de hidrógeno con Leu²²⁸ y Gly²²⁹; estas interacciones sirven para posicionar el ala W1 próximo al extremo N-terminal de la hélice de reconocimiento $\alpha 3$. Mutagénesis en estos aminoácidos conservados afectan la función de OmpR y otras proteínas relacionadas (Russo y col., 1993; Aiba y col., 1994; Kato y col., 1995). El alto grado de conservación de

los residuos denotan la importancia de las interacciones mencionadas que estarían conservadas en todos los miembros de la familia (Martínez-Hackert y Stock, 1997b; Rhee y col., 2008). Estos datos que surgen de la estructura de OmpR sugieren que en HrpG, la sustitución de Arg²¹⁰ por un residuo de Cys, estaría afectando las interacciones conservadas del residuo de arginina con otros residuos cercanos que permiten el correcto plegamiento del dominio de unión al ADN de la proteína. El aminoácido arginina es un aminoácido básico, polar, con carga positiva en su grupo R de guanidina; mientras que la cisteína es polar, sin carga y contiene un grupo tiol (-SH) en su cadena lateral capaz de oxidarse y formar enlaces disulfuro (Lehninger y col., 1985). El grupo R de la arginina es más voluminoso que el de la cisteína, pudiendo causar también alguna interacción alostérica con otros aminoácidos o estructuras de la proteína. Estas observaciones sugieren que a pesar de la unión al ADN, la Cys afectaría interacciones esenciales para el correcto funcionamiento de la proteína, y allí podría radicar la causa de los diferentes fenotipos observados entre la cepa salvaje de Xac y aquellas que contienen el regulador mutante R210C, que no pueden producir los síntomas de cancrrosis en las hojas de citrus.

Los motivos de unión de OmpR contienen 2 hemi-sitios de 10 bases cada uno orientados en tándem (Martínez-Hackert y Stock, 1997b). Sin embargo, se vio que una molécula de OmpR no es capaz de unirse a un hemi-sitio; sino que 2 moléculas de OmpR son necesarias para unirse a un sitio completo (Huang e Igo, 1996) y algunos reguladores de la familia OmpR/PhoB se unen a secuencias invertidas (King-Scott y col., 2007). Debido a que no se identificaron homodímeros de OmpR en solución, se propuso que OmpR dimeriza cuando se une al ADN en la forma “dos al mismo tiempo” (del inglés “two at a time”), es decir que dos moléculas de OmpR se unen simultáneamente al ADN (Martínez-Hackert y Stock, 1997b; Yoshida y col., 2006; Rhee y col., 2008). Sin embargo, recientemente se observó que OmpR puede unirse a un sitio de reconocimiento de alta afinidad como monómero y al unirse al ADN se producen cambios conformacionales en la hélice $\alpha 3$ de reconocimiento, y las alas W1 y W2 (Rhee y col., 2008). Se sugirió que existe un mecanismo de dimerización común en la subfamilia OmpR, a pesar de las diferencias funcionales entre los miembros de la familia, pero esto ha sido cuestionado recientemente al analizar la estructura cristalográfica de RegX3 de *M. tuberculosis*, que sugiere un modelo de dimerización del tipo “intercambio de dominios” (del inglés “domain-swap”) (King-Scott y col., 2007). Este modo de dimerización describe la formación de una interacción simétrica entre dos moléculas a través del intercambio de

regiones idénticas, que puede ser un solo elemento de estructura secundaria o un dominio globular completo (Rousseau y col., 2003). A pesar de que muchas proteínas muestran este comportamiento, la función y el rol fisiológico todavía no se conocen. Algunas ventajas de la dimerización por “intercambio de dominios” incluirían el aumento de la concentración local de sitios activos, superficies de unión más grandes, nuevos sitios activos en la interface de las subunidades, la posibilidad de control alostérico, etc. (Liu y Eisenberg, 2002). En la estructura de RegX3 se determinó que las estructuras secundarias $\alpha 4$, $\beta 5$ y $\alpha 5$ del dominio receptor *N*-terminal del regulador, serían los involucrados en el “intercambio de dominios” (King-Scott y col., 2007). Un modelo probable propuesto para la activación de OmpR y que engloba diversas evidencias experimentales de los últimos años consiste en la unión del dominio *C*-terminal a secuencias de ADN con alta afinidad como monómero. Como consecuencia de esta unión se produce un cambio conformacional que se transmite al dominio *N*-terminal de la proteína, promoviendo la fosforilación y la dimerización, posiblemente mediante el “intercambio de dominios” (o domain swapping). De esta manera, se permitiría la unión de un segundo monómero de OmpR que formaría un dímero simétrico o asimétrico dependiendo del sitio de unión en el ADN. La región linker flexible, entre los extremos *N*-terminal y *C*-terminal de la proteína promueve cambios conformacionales y permite que el segundo monómero se una en múltiples orientaciones dependiendo de la secuencia de ADN específica (Rhee y col., 2008).

A pesar del gran avance logrado en los últimos años en cuanto a la estructura de las proteínas de la familia OmpR y sus mecanismos de acción, aún quedan muchas preguntas por responder. Asimismo, entre las proteínas HrpG de *Xanthomonas*, la ausencia de una estructura tridimensional conocida y la falta de un mecanismo detallado de su función regulatoria dificultan la comprensión de los procesos regulatorios que controlan el SSTT y otras funciones esenciales para la patogenicidad. Por ejemplo, se sabe que la expresión de *hrpG* en *Xanthomonas* está levemente inducida en ciertos medios de crecimiento mínimos y en la superficie de la planta, sin embargo una inducción significativa se observa cuando la bacteria entra en el apoplasto vegetal, aunque todavía no se conoce el o los factores que controlan la expresión transcripcional de *hrpG* (Wengelnik y col., 1996b; Zhang y col., 2009). A pesar de que en *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* spp. y *Ralstonia solanacearum* se identificaron numerosos genes regulatorios del cluster *hrp* involucrados en un sistema regulatorio complejo, en *Xanthomonas* sólo se identificaron los genes *hrpG*

y *hrpX* (Wengelnik y Bonas, 1996; Wengelnik y col., 1996b). En *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), el agente causal de la plaga bacteriana en arroz, existen evidencias experimentales recientes que sugieren que la expresión de *hrpG* es controlada por múltiples vías regulatorias incluyendo el sistema de dos componentes PhoPQ, una proteína con dominio H-NS asociado al nucleóide bacteriano denominada XrvA, y el regulador transcripcional Trh (Lee y col., 2008; Feng y col., 2009; Tsuge y col., 2006). En particular, el regulador *trh* (del inglés transcriptional regulator for *hrp*) identificado en Xoo, tiene homología de dominios con la familia de reguladores GntR, que poseen un motivo hélice-giro-hélice en la región *N*-terminal y actúan reprimiendo o activando diversos operones bacterianos (Tsuge y col., 2006). En una cepa de Xoo mutante en *trh*, la expresión de *hrpG* se vio reducida, aunque no completamente, en condiciones inductoras de los genes *hrp* *in vitro* e *in planta* (Tsuge y col., 2006). Estos resultados sugieren que Trh activa directa o indirectamente la expresión de *hrpG*, y que podría actuar junto a otra proteína regulatoria aún no identificada o mediante una compleja red regulatoria que incluya también al sistema de dos componentes PhoPQ y la proteína XrvA (Lee y col., 2008; Feng y col., 2009). En el genoma de Xoo, el gen *trh* está localizado lejos del cluster *hrp* y de los genes regulatorios *hrpG* y *hrpX*, y se encuentra cerca de genes del sistema de secreción tipo dos (SSTD), por lo que también podría estar involucrado en la expresión de genes distintos a los genes *hrp*. En el genoma publicado de Xac, se encuentra el gen XAC3532, también localizado lejos de los genes *hrp* y cerca de genes relacionados con el SSTD. Xac3532 y *trh* de Xoo (XOO0783) tienen la misma longitud en aminoácidos y poseen un 95 % y 91 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente; sugiriendo que Xac3532 podría cumplir un rol similar al de su homólogo en Xoo.

En la mayoría de las proteínas reguladoras de respuesta la fosforilación en el dominio regulador de respuesta induce cambios conformacionales que activan y promueven la dimerización de la proteína, que luego se traduce en la unión a los elementos regulatorios de las regiones promotoras de los genes que regulan. HrpG es un regulador de respuesta multidominio y se postula que la proteína sería fosforilada en un residuo de ácido aspártico conservado en el extremo *N*-terminal, que presenta homología con la proteína de quimiotaxis CheY, con una estructura terciaria ampliamente estudiada (Volz y Matsumura, 1991; Cho y col., 2000). En CheY existen 4 residuos críticos para la fosforilación y activación de la proteína, Asp¹², Asp¹³, Asp⁵⁷ y Lys¹⁰⁹. El residuo Asp⁵⁷ es

fosforilado por la proteína sensora, y está cercano a los residuos Asp¹² y Asp¹³ formando un bolsillo ácido, junto con la Lys¹⁰⁹. Se postula que la fosforilación en el Asp⁵⁷ desplaza la Lys¹⁰⁹, induciendo cambios conformacionales en la proteína que conducen a su activación. El residuo Asp⁵⁷ está conservado en HrpG de Xcv y Xac (Asp⁶⁰) sugiriendo que también podría ser fosforilado, aunque la estructura y los aminoácidos que forman el bolsillo ácido están parcialmente conservados (Wengelnik y col., 1996b). En OmpR, la quinasa EnvZ que se localiza en la membrana interna, percibe cambios en la osmolaridad y se activa autofosforilándose en un residuo de histidina y luego transfiere el grupo fosfato al Asp⁵⁵ de OmpR. EnvZ también regula la defosforilación de OmpR-fosfato, controlando de esta manera su concentración celular (Ames y col., 1999). Se ha demostrado que la fosforilación de OmpR aumenta su afinidad por las regiones promotoras de los genes *ompF* y *ompC*, sin embargo también se observó que en presencia de secuencias de ADN específicas, existe una dramática estimulación en la fosforilación de OmpR (Ames y col., 1999). Se ha visto que OmpR, PhoB y VirG incrementan su unión a secuencias de ADN específicas cuando son fosforiladas, y este efecto es independiente de la fuente de fosforilación, que puede ser mediada por la quinasa EnvZ o por agentes fosforilantes como el acetil fosfato (Wengelnik y col., 1996b). En los ensayos de unión realizados con HrpG y R210C, las proteínas no fueron fosforiladas, y sin embargo se observó la unión a las regiones promotoras. OmpR no fosforilada también puede unirse al ADN con una afinidad relativamente alta (Kd de 200 nM aprox.) en presencia de secuencias específicas. Sin embargo, si OmpR está en presencia de secuencias o sitios de baja afinidad primero debe fosforilarse para poder unirse al ADN (Ames y col., 1999). Esto sugiere que HrpG podría actuar de manera similar a OmpR, con la capacidad de unirse al ADN en su estado no fosforilado en presencia de secuencias promotoras específicas.

En ciertas proteínas regulatorias como NarL debe ocurrir la fosforilación en el dominio *N*-terminal de la proteína para exponer el dominio de unión y permitir la unión efectiva al ADN (Maris y col., 2002); y en CheB de *Salmonella typhimurium*, la fosforilación estimula la actividad metilestearasa del *C*-terminal, mientras que en ausencia de fosforilación la actividad es inhibida (Djordjevic y col., 1998). En OmpR la situación es diferente ya que en ausencia de fosforilación la proteína puede unirse al ADN (Ames y col., 1999) y el *C*-terminal no está inhibido por el *N*-terminal. HP-RR (Hp1043) de *Helicobacter pylori*, es un regulador de respuesta esencial para el crecimiento celular que

también puede unirse a secuencias específicas de ADN en ausencia de fosforilación (Hong y col., 2007). Mediante RMN y cristalografía de rayos X, se determinó que la estructura de este regulador consiste en un dímero simétrico con 2 dominios funcionales, es estable en solución aún en estado no fosforilado; y la topología molecular es similar a la familia OmpR/PhoB (Hong y col., 2007). Este regulador podría funcionar en ausencia de una modificación post-traducciona, ya que HP-RR no pudo ser fosforilado *in vitro* y la fosforilación no es necesaria para su función *in vivo*. A diferencia de PhoB y otros reguladores, en el caso de HP-RR el dominio regulatorio no inhibe la actividad de unión al ADN del dominio de transactivación, los 2 dominios podrían entonces actuar de manera independiente. A diferencia de otros reguladores como PhoP y BvgV que pueden unirse al ADN en ausencia de fosforilación, HP-RR no aumenta su fosforilación con la unión al ADN (Hong y col., 2007). HP-RR no posee el residuo Asp⁵⁵ conservado que es fosforilado en CheY y tampoco posee la secuencia consenso del bolsillo ácido para la reacción de fosfotransferencia en CheY, sin embargo la topología molecular es similar a la de la familia OmpR/PhoB y las superficies de dimerización formadas por los elementos de estructura secundaria son similares a la forma activa y fosforilada de PhoB (Hong y col., 2007). HrpG, que posee el bolsillo ácido de CheY parcialmente conservado, podría actuar de manera similar a HP-RR, sin necesidad de ser fosforilado previo a su interacción con las secuencias de ADN que regula. El efecto de la fosforilación también se estudió en otros reguladores de respuesta como NtrC, Spo0A y FixJ y en todos los casos se reportó que la fosforilación induce cambios conformacionales (Hong y col., 2007), por lo que experimentos futuros de fosforilación y dimerización de HrpG, permitirán comprender en profundidad el mecanismo de acción de la proteína. Las diferencias en los mecanismos de activación de los distintos reguladores estudiados se pueden deber a diferencias en la región linker; su longitud y conformación permitirían la existencia o no de las distintas conformaciones de las proteínas implicando también la existencia de un equilibrio entre los estados de fosforilación, dimerización y en última instancia de unión y activación de las mismas (Ames y col., 1999).

Hasta el momento no existen evidencias de una proteína quinasa asociada a HrpG en un sistema de dos componentes. Muchos reguladores, como HP-RR de *H. pylori*, son considerados “huérfanos” ya que no se han identificado histidina quinasa asociadas a los mismos (Hong y col., 2007). Sin embargo, mediante ensayos de doble híbrido en levaduras se identificaron interacciones proteína-proteína que involucran a componentes

del SSTT de Xac (Alegria y col., 2004). En estos estudios, se observó que HrpG interactuó consigo mismo, indicando la posible dimerización de HrpG a pesar de que en los reguladores de la familia OmpR aún se desconoce exactamente el mecanismo de dimerización (discutido anteriormente). HrpG también interactuó con la proteína hipotética XAC0095, que tendría un rol en la regulación de la expresión génica, la proteína XAC1568, y XAC3683 que codifica un componente histidina quinasa sensora/regulador de respuesta de sistemas de dos componentes bacterianos (Alegria y col., 2004). Esta última interacción es consistente con la hipótesis de que HrpG formaría parte de un sistema de dos componentes. Xac3683 posee motivos PAS y PAC en el extremo *N*-terminal, generalmente asociados con dominios sensores de señal, dominios centrales histidina quinasa y fosfoceptor, y un dominio regulador de respuesta receptor en el *C*-terminal de la proteína (Taylor y Zhulin, 1999). A pesar de estas observaciones, todavía faltan evidencias bioquímicas que confirmen la interacción de HrpG con esta proteína quinasa sensora, y que indiquen la posible participación de HrpG en un sistema de dos componentes bacteriano típico para activar el SSTT.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Al igual que otros patógenos bacterianos, las especies del género *Xanthomonas* han adaptado distintos sistemas regulatorios para controlar la expresión de factores de virulencia en respuesta a distintos estímulos y condiciones ambientales. Esto les permite atravesar distintas etapas de su ciclo de vida, desde la supervivencia epifítica sobre la superficie de las hojas hasta la invasión y colonización del espacio intercelular. Uno de los principales sistemas involucrados en la patogenicidad es el SSTT, codificado por el cluster génico *hrp*, que contiene más de 20 genes organizados en distintas unidades transcripcionales y permite, entre otras cosas, la translocación de proteínas efectoras al citoplasma de la célula vegetal hospedadora, que en muchos casos pueden suprimir la respuesta inmune innata de la planta generando enfermedad, como la cancrrosis de los cítricos (White y col., 2009). De los numerosos genes identificados en el genoma de *Xac* (da Silva y col., 2002) que codifican proteínas efectoras putativas, en este trabajo de tesis se estudiaron *AvrXacE1*, *AvrXacE2* y *Xac3090*. Mediante la construcción de cepas mutantes en los genes en estudio se observaron diferencias en los fenotipos de virulencia en las cepas Δ *avrXacE1* y Δ *avrXacE2*, que mostraron lesiones con áreas necróticas más extensas que las producidas por la cepa salvaje en hojas de naranja. Debido a que *Xac* es un patógeno biotrófico, estas proteínas podrían cumplir un rol clave en el retraso temporal de la necrosis ocasionada en la planta hospedadora para prolongar la supervivencia del patógeno. Por el contrario Δ *xac3090* no mostró diferencias con la cepa salvaje sugiriendo que podría actuar en forma conjunta con otros efectores aún no caracterizados. Los estudios llevados a cabo no mostraron una relación directa entre estas proteínas y la respuesta HR en plantas no hospedadoras, lo cual no permite vincularlas con el desencadenamiento de esta respuesta.

Por otro lado, para complementar resultados obtenidos previamente en el laboratorio que permitieron identificar proteínas de *Citrus sinensis* que posiblemente interactúan con estas proteínas efectoras (Dunger, 2007), se realizaron ensayos de localización subcelular mediante expresión transiente *in planta*. Estos experimentos mostraron localizaciones subcelulares para las proteínas efectoras que concuerdan con los resultados de interacción con proteínas de la planta. La falta de resultados *in vitro* que confirmen las interacciones observadas en el ensayo de doble híbrido dificulta la

asignación de un rol específico para cada proteína efectora, sin embargo los ensayos de localización subcelular, permitieron abrir un camino para continuar la búsqueda de la función de dichas proteínas en la célula hospedadora durante el desarrollo de la enfermedad. La continuidad en el estudio del repertorio de proteínas efectoras de Xac permitirá comprender los mecanismos moleculares que determinan el rango de hospedador y que caracterizan la interacción Xac-cítricos.

Los genes *hrp* son esenciales para la patogenicidad en plantas susceptibles y la inducción de respuesta HR en plantas resistentes. Bacterias mutantes en los genes *hrp* no solo son incapaces de establecer una interacción normal con la planta, sino que también son incapaces de crecer en el tejido vegetal (Alfano y Collmer, 1997). En *Xanthomonas* los genes *hrp* se expresan *in planta* y están regulados a nivel transcripcional por dos proteínas, HrpG y HrpX. En Xcv se ha propuesto un modelo regulatorio que sitúa a HrpG como el regulador principal del cluster *hrp* (Wengelnik y col., 1996b). A fin de estudiar en profundidad la regulación del cluster y el rol de HrpG en la patogénesis de Xac, en principio se construyeron dos cepas denominadas XacHrpG y XacR210C, que contienen un plásmido replicativo y sobreexpresan constitutivamente la proteína HrpG y la proteína mutante R210C, respectivamente. R210C se obtuvo por una mutación espontánea que implica la sustitución del residuo Arg²¹⁰ por Cys. Además, se construyó una cepa mutante en *hrpG*, que se complementó con la proteína salvaje y la proteína mutante R210C. En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que HrpG es esencial para la patogenicidad de Xac en plantas hospedadoras y para el desencadenamiento de la respuesta HR en plantas no hospedadoras. Asimismo, se vio que es necesaria para la expresión de los genes del cluster *hrp* en condiciones inductoras como el medio mínimo XVM2 y en el interior de las células vegetales. Mediante los ensayos realizados durante la tesis no fue posible establecer una relación entre HrpG y la secreción de otros factores de virulencia secretados principalmente por el SSTD, así como no se encontraron alteraciones en la movilidad bacteriana de las cepas construidas. Sin embargo, numerosos estudios recientes en *Xanthomonas* sugieren que HrpG, además del cluster *hrp*, regula otros procesos y funciones celulares críticos para la supervivencia y patogenicidad de la bacteria, sugiriendo un rol regulatorio complejo y global para HrpG (Astua-Monge y col., 2005; Tang y col., 2006; Büttner y Bonas 2010; Moreira y col., 2010a; Guo y col., 2011).

En particular, se vio que la proteína mutante R210C no es completamente funcional, lo cual no permite el correcto ensamblado y la activación del SSTT que es crítico para colonizar la planta hospedadora mediante la translocación de proteínas efectoras. La mutación R210C obtenida en HrpG de *Xac* se encuentra en la región C-terminal de la proteína, específicamente en un motivo de unión a ADN altamente homólogo a los reguladores transcripcionales de la subfamilia OmpR/PhoB. El aa Arg²¹⁰ de *Xac* está conservado con el aa Arg²⁰⁹ de OmpR de *E. coli* que está localizado en una estructura de α hélice que forma el motivo hélice-giro-hélice en el dominio de unión a ADN. Se determinó que Arg²⁰⁹ de OmpR establecería un contacto directo con el esqueleto fosfatídico de las secuencias de ADN que reconoce (Martínez-Hackert y Stock, 1997b; Rhee y col., 2008). La mutación R210C sería el primer ejemplo de una mutación puntual con pérdida de función en HrpG de *Xanthomonas*, y debido a la deficiencia en la patogénesis que mostraron las cepas de *Xac* construidas con esta proteína resultó de interés la caracterización molecular de la función regulatoria de HrpG y R210C. Por tal motivo, se llevó a cabo el estudio *in silico* y mediante fusiones transcripcionales de posibles regiones promotoras que serían reconocidas por HrpG. Luego, las mismas se utilizaron como sondas en ensayos de retardo en gel de la movilidad electroforética a fin de determinar la unión de HrpG y R210C a dichas secuencias de ADN. A pesar de los numerosos estudios realizados mediante fusiones transcripcionales, mutagénesis en HrpG y estudios de microarreglos que muestran las funciones y procesos celulares en los que estaría involucrada HrpG (Wengelnik y col., 1996b; Wengelnik y col., 1999; Guo y col., 2011), no existen evidencias directas de que sea capaz de reconocer y unirse a las secuencias promotoras de los genes que regula; por lo que los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera evidencia de que HrpG es funcionalmente activa como regulador transcripcional, debido a la observación de su unión a las regiones promotoras. Esto también confirma que el modelo regulatorio propuesto en *Xcv* es válido para la regulación del cluster *hrp* de *Xac*, donde HrpG se uniría a los promotores de los genes *hrpX* y *hrpG*, pero actuando como regulador positivo y negativo, respectivamente. Por otro lado, se observó que R210C, a pesar de tener mutado el residuo altamente conservado de Arg²¹⁰, no perdió la capacidad de unirse a las mismas regiones de ADN reconocidas por la proteína salvaje y con igual afinidad, indicando que la ausencia de actividad en esta proteína radicaría en la falta de activación transcripcional, ya sea por cambios conformacionales en la proteína que

afecten otros mecanismos como su fosforilación y dimerización, o la interacción con la ARN polimerasa.

A pesar de los numerosos estudios estructurales y funcionales en reguladores transcripcionales de la subfamilia OmpR/PhoB aún se desconocen los mecanismos específicos que conducen a sus funciones regulatorias. Asimismo, la falta de estudios estructurales y de un mecanismo detallado de la función regulatoria de las proteínas HrpG del género *Xanthomonas*, dificultan la comprensión de la regulación del cluster *hrp* y la compleja interacción con otros mecanismos celulares bacterianos que conducen al éxito de la colonización de las respectivas plantas hospedadoras.

RESUMEN

8. RESUMEN

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) es el agente causal de la cancrrosis de los cítricos, que afecta al género *Citrus* en todo el mundo. Debido a la ausencia de patovares resistentes a la enfermedad y la falta de mecanismos efectivos de control y erradicación, resulta interesante estudiar los mecanismos moleculares responsables de esta interacción planta-patógeno compatible. Entre los mecanismos de patogenicidad de Xac, el estudio de las proteínas efectoras y el rol que cumplen en la célula hospedadora, así como el estudio del regulador HrpG del SSTT son objeto de estudio en el presente trabajo de tesis.

Estudios previos realizados en el laboratorio iniciaron la caracterización de las proteínas efectoras AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 de Xac, mediante ensayos de interacción con proteínas de *Citrus sinensis* en un sistema de doble híbrido en levaduras; y la construcción de cepas mutantes en dichas proteínas. En este trabajo de tesis se profundizó la caracterización de estos efectores de Xac construyendo una cepa doble mutante en los genes *avrXacE1* y *avrXacE2* y complementando las cepas mutantes construidas anteriormente. Se determinó la patogenicidad de las cepas construidas en plantas hospedadoras de naranja y no hospedadoras. Los fenotipos observados sugieren que AvrXacE1 y AvrXacE2 actuarían en forma separada afectando distintas vías de señalización que modifican la necrosis del tejido vegetal. El crecimiento bacteriano *in planta* mostró un menor crecimiento de las cepas Δ avrXacE1, Δ avrXacE2 y Δ avrXacE1/E2 en relación a la cepa salvaje, consistente con las lesiones más necróticas observadas que no son favorables para un patógeno biotrófico como Xac. Los resultados indican que las proteínas en estudio no estarían involucradas en la respuesta HR. A fin de dilucidar la función de las proteínas efectoras de Xac dentro de la planta se determinó su localización subcelular mediante la expresión transiente en hojas de *N. benthamiana* de AvrXacE1, AvrXacE2 y Xac3090 fusionadas a GFP. Las localizaciones subcelulares observadas para las distintas proteínas son consistentes con los resultados del ensayo de doble híbrido. En conjunto, el estudio de las cepas mutantes y la localización subcelular de las proteínas efectoras de Xac, junto con los resultados previos, aportan una perspectiva interesante para profundizar el estudio del rol de estas proteínas en la cancrrosis de los cítricos.

El SSTT codificado por el cluster *hrp* es esencial para la patogenicidad y virulencia de las bacterias fitopatógenas como *Xac*. Los genes *hrp* se inducen mediante la proteína reguladora HrpG, perteneciente a la familia OmpR/PhoB de reguladores transcripcionales. A fin de estudiar el rol de HrpG durante la cancrrosis se construyeron las cepas sobreexpresantes *XacHrpG* y *XacR210C* que posee el regulador HrpG con una mutación puntual en el residuo Arg²¹⁰, y la cepa mutante *XacΔhrpG*. Se caracterizaron estas cepas en la cancrrosis mediante inoculaciones en hojas de naranja y curvas de crecimiento *in planta*, y en la respuesta HR en plantas no hospedadoras. Estos ensayos muestran que el SSTT de *Xac* es esencial para la patogenicidad, para el desarrollo de la enfermedad en la planta hospedadora mediante la secreción de proteínas y factores de virulencia, y para el desencadenamiento de la respuesta HR en plantas no hospedadoras. Además se observó que el regulador mutante R210C no sería funcional, impidiendo la correcta expresión de los componentes del SSTT. Se caracterizaron la movilidad bacteriana y la secreción de diversos factores de virulencia en las cepas construidas a fin de comprender el rol de HrpG como regulador de múltiples procesos celulares involucrados en la patogenicidad. El análisis transcripcional de las cepas permitió concluir que HrpG es esencial para la activación transcripcional de los genes *hrp*, mientras que el regulador mutante R210C no es funcional. A fin de dilucidar el rol del aa Arg²¹⁰ de HrpG que está altamente conservado en el motivo de unión a ADN de la familia de reguladores transcripcionales OmpR/PhoB, se realizaron ensayos de interacción ADN-proteína entre HrpG y R210C con las regiones promotoras de los genes *hrpX* y *hrpG* que son regulados positiva y negativamente por HrpG, respectivamente. Previamente se realizó un análisis de las regiones promotoras, y se purificaron las proteínas HrpG y R210C recombinantes que se utilizaron en los ensayos de retardo. HrpG y R210C fueron capaces de reconocer y unirse específicamente a secuencias regulatorias en los promotores de *hrpX* y *hrpG* con una afinidad similar, confirmando el rol de HrpG como regulador transcripcional. Finalmente, alineamientos de secuencia y modelados estructurales de HrpG y R210C muestran que Arg²¹⁰ es un residuo altamente conservado que participaría en la unión directa al ADN. La continuidad en el estudio de HrpG y R210C permitirá dilucidar el mecanismo de acción de HrpG, su rol en la regulación del SSTT y de diversos factores de virulencia, que posicionan a esta proteína como un regulador global de la patogenicidad y virulencia en las bacterias del género *Xanthomonas*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994).** Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621-628.
- Agrios G (2004).** *Plant Pathology*. New York. Academic Press.
- Aiba H, Kato N, Tsuzuki M, Mizuno T (1994).** Mechanism of gene activation by the *Escherichia coli* positive regulator, OmpR: a mutant defective in transcriptional activation. *FEBS Lett.* 351:303-307.
- Akeda Y, Galán JE (2005).** Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437:911-915.
- Alberti L, Harshey RM (1990).** Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J. Bacteriol.* 172:4322-4328.
- Alegria MC, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS (2004).** New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *J. Bacteriol.* 186:6186-6197.
- Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS (2005).** Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Bacteriol.* 187:2315-2325.
- Alfano JR (2009).** Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Mol. Plant Pathol.* 10:805-813.
- Alfano JR, Charkowski AO, Deng WL, Badel JL, Petnicki-Ocwieja T, van Dijk K, Collmer A (2000).** The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4856-4861.
- Alfano JR, Collmer A (1996).** Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell* 8:1683-1698.
- Alfano JR, Collmer A (1997).** The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* 179:5655-5662.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers E, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK (2005).** Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272:5101-5109.
- Alvarez AM, Benedict AA, Mizumoto CY, Hunter JE, Gabriel DW (1994).** Serological pathological and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84:1449-1457.

- Ames SK, Frankema N, Kenney LJ (1999).** C-terminal DNA binding stimulates N-terminal phosphorylation of the outer membrane protein regulator OmpR from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:11792-11797.
- Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM (2005).** The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. FEMS Microbiol. Rev. 29:231-262.
- Arlat M, Gough CL, Barber CE, Boucher C, Daniels MJ (1991).** *Xanthomonas campestris* contains a cluster of hrp genes related to the larger hrp cluster of *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:593-601.
- Arlat M, Van Gijsegem F, Huet JC, Pernollet JC, Boucher CA (1994).** PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific Petunia genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. EMBO J. 13:543-553.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006).** The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. Bioinformatics 22:195-201.
- Astua-Monge G, Freitas-Astua J, Bacocina G, Roncoletta J, Carvalho SA, Machado MA (2005).** Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. J. Bacteriol. 187:1201-1205.
- Ausubel EM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987).** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.
- Baikalov I, Schröder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Cascio D, Gunsalus RP, Dickerson RE (1998).** NarL dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. Biochemistry 37:3665-3676.
- Baikalov I, Schröder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Grzeskowiak K, Gunsalus RP, Dickerson RE (1996).** Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. Biochemistry 35:11053-11061.
- Baker NR, Rosenqvist E (2004).** Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. J. Exp. Bot. 55:1607-1621.
- Baptista JC, Machado MA, Homem RA, Torres PS, Vojnov AA, do Amaral AM (2010).** Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. Genet. Mol. Biol. 33:146-153.
- Bardy SL, Ng SY, Jarrell KF (2003).** Prokaryotic motility structures. Microbiology 149:295-304.
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC (1999).** *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:266-292.
- Berger S, Menudier A, Julien R, Karamanos Y (1995).** Do de-N-glycosylation enzymes have an important role in plant cells? Biochimie 77:751-760.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T (2007).** Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. J. Exp. Bot. 58:4019-4026.

- Boller T, He SY (2009).** Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324:742-744.
- Bonas U (1994).** *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 192:79-78.
- Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage GV, Staskawicz BJ, Stall RE (1991).** Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:81-88.
- Bonas U, Van den Ackerveken G, Büttner D, Hahn K, Marois E, Nennstiel D, Noël L, Rossier O, Szurek B (2000).** How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. *Mol. Plant Pathol.* 1:73-76.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T (2009).** Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* 4:1-13.
- Boucher CA, Van Gijsegem F, Barberis PA, Arlat M, Zischek C (1987).** *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *J. Bacteriol.* 169:5626-5632.
- Bradbury JF (1984).** Genus II *Xanthomonas* Dowson 1939. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Krieg NR and Holt JG, eds). 1:199-210. Williams and Wilkins, London.
- Brito B, Marendra M, Barberis P, Boucher C, Genin S (1999).** *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 31:237-251.
- Brunings AM, Gabriel DW (2003).** *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4:141-157.
- Brusin FJ, Rossbach S (1994).** Transposon mutagenesis. En *methods for general and molecular bacteriology*. Gherehardt P, Murray RGE, Wood W & Krieg NR. Society for Microbiology Press, Washington DC; 387-405.
- Brzostek K, Raczowska A, Zasada A (2003).** The osmotic regulator OmpR is involved in the response of *Yersinia enterocolitica* O:9 to environmental stresses and survival within macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 228:265-271.
- Büttner D (2012).** Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:262-310.
- Büttner D, Bonas U (2002).** Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* 21:5313-5322.
- Büttner D, Bonas U (2010).** Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:107-133.
- Büttner D, He SY (2009).** Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 150:1656-1664.
- Büttner D, Nennstiel D, Klüsener B, Bonas U (2002).** Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 184:2389-2398.

- Canteros BI (1999).** Identificación y manejo de enfermedades fúngicas y bacterianas en citrus. Parte 1: Ilustraciones. EEA INTA Bella Vista multicopiado 29. Parte 2: Texto. EEA INTA multicopiado 28.
- Canteros BI (2001).** Cancrosis de los cítricos. *IDIAXXI* (1): 23-27.
- Caplan J, Padmanabhan M, Dinesh-Kumar SP (2008).** Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* 3:126-135.
- Castañeda A, Reddy JD, El-Yacoubi B, Gabriel DW (2005).** Mutagenesis of all eight *avr* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one *avr* gene affected race specificity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:1306-1317.
- Castelli ME, Fedrigo GV, Clementín AL, Ielmini MV, Feldman MF, García Vescovi E (2008).** Enterobacterial common antigen integrity is a checkpoint for flagellar biogenesis in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 190:213-220.
- Chan AW, Hutchinson EG, Harris D, Thornton JM (1993).** Identification, classification, and analysis of beta-bulges in proteins. *Protein Sci.* 2:1574-1590.
- Chang JH, Goel AK, Grant SR, Dangl JL (2004).** Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:11-18.
- Chang JH, Urbach JM, Law TF, Arnold LW, Hu A, Gombar S, Grant SR, Ausubel FM, Dangl JL (2005).** A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:2549-2554.
- Charkowski AO, Huang HC, Collmer A (1997).** Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 179:3866-3874.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006).** Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.
- Cho HS, Lee SY, Yan D, Pan X, Parkinson JS, Kustu S, Wemmer DE, Pelton JG (2000).** NMR structure of activated CheY. *J. Mol. Biol.* 297:543-551.
- Christie PJ (2001).** Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40:294-305.
- Clantin B, Hodak H, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F, Villeret V (2004).** The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:6194-6199.
- Coll NS, Epple P, Dangl JL (2011).** Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 18:1247-1256.
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011).** Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* 11:163.
- Cui H, Xiang T, Zhou JM (2009).** Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cell. Microbiol.* 11:1453-1461.
- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LE,**

- Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, de Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
- Dangl JL, Jones JD (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Dangl JL, McDowell JM (2006). Two modes of pathogen recognition by plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:8575-8576.
- de Lorenzo V, Timmis KN (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 235:386-405.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:8024-8029.
- Dharmapuri S, Sonti RV (1999). A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 179:53-59.
- Djordjevic S, Goudreau PN, Xu Q, Stock AM, West AH (1998). Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:1381-1386.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CI, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:8888-8893.
- dos Reis SP, Lima AM, de Souza CR (2012). Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 13:8628-8647.
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:10995-11000.
- Duan YP, Castañeda AL, Zhao G, Erdos G, Gabriel DW (1999). Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:556-560.
- Dunger G (2007). Caracterización molecular del fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, responsable de la cancrrosis en cítricos. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Fac. de Ciencias Bioq. y Farm., UNR, Rosario, Argentina.

- Dunger G, Arabolaza AL, Gottig N, Orellano EG, Ottado, J (2005).** Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *hrp* cluster in citrus canker and in non-host plants response. *Plant Pathol.* 54:781-788.
- Dunger G, Garofalo CG, Gottig N, Garavaglia BS, Rosa MC, Farah CS, Orellano EG, Ottado J (2012).** Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins. *Mol. Plant Pathol.* 13:865-876.
- Dunger G, Relling VM, Tondo ML, Barreras M, Ielpi L, Orellano EG, Ottado J (2007).** Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.* 188:127-135.
- Durrant WE, Dong X (2004).** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185-209.
- Dye EW, Lelliott RA (1974).** Genus II *Xanthomonas*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Buchanan RE and Gibbons NE, eds), 243-249. Williams y Wilkins, Baltimore.
- Erhardt M, Namba K, Hughes KT (2010).** Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a000299. doi:10.1101/cshperspect.a000299.
- Feng JX, Song ZZ, Duan CJ, Zhao S, Wu YQ, Wang C, Dow JM, Tang JL (2009).** The *xrvA* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, encoding an H-NS-like protein, regulates virulence in rice. *Microbiology* 155:3033-3044.
- Fenselau S, Bonas U (1995).** Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:845-854.
- Figueiredo JF, Römer P, Lahaye T, Graham JH, White FF, Jones JB (2011).** *Agrobacterium*-mediated transient expression in citrus leaves: a rapid tool for gene expression and functional gene assay. *Plant Cell Rep.* 30:1339-1345.
- Finlay BB, Falkow S (1997).** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:136-169.
- Flor HH (1956).** The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8:29-54.
- Flor HH (1971).** Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
- Fuhrmann A, Schoening JC, Anselmetti D, Staiger D, Ros R (2009).** Quantitative analysis of single-molecule RNA-protein interaction. *Biophys. J.* 96:5030-5039.
- Fujikawa T, Ishihara H, Leach JE, Tsuyumu S (2006).** Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:342-349.
- Gabriel DW, Kingsley MT, Hunter JE, Gottwald TR (1989).** Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 39:14-22.

- Gajiwala KS, Burley SK (2000).** Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:110-116.
- Galán JE, Collmer A (1999).** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322-1328.
- Galán JE, Wolf-Watz H (2006).** Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444:567-573.
- Galperin MY (2006).** Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* 188:4169-4182.
- Garavaglia BS (2010).** Estudio de determinantes de patogenicidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Fac. de Ciencias Bioq. y Farm., UNR, Rosario, Argentina.
- Garavaglia BS, Thomas L, Gottig N, Dunger G, Garofalo CG, Daurelio LD, Ndimba B, Orellano EG, Gehring C, Ottado J (2010a).** A eukaryotic-acquired gene by a biotrophic phytopathogen allows prolonged survival on the host by counteracting the shut-down of plant photosynthesis. *PLoS One* 5(1):e8950. doi:10.1371/journal.pone.0008950.
- Garavaglia BS, Thomas L, Gottig N, Zimaro T, Garofalo CG, Gehring C, Ottado J (2010c).** Shedding light on the role of photosynthesis in pathogen colonization and host defense. *Commun. Integr. Biol.* 3:382-384.
- Garavaglia BS, Thomas L, Zimaro T, Gottig N, Daurelio LD, Ndimba B, Orellano EG, Ottado J, Gehring C (2010b).** A plant natriuretic peptide-like molecule of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causes rapid changes in the proteome of its citrus host. *BMC Plant Biol.* 21:10:51.
- Garrett S, Silhavy TJ (1987).** Isolation of mutations in the α operon of *Escherichia coli* that suppress the transcriptional defect conferred by a mutation in the porin regulatory gene *envZ*. *J. Bacteriol.* 169:1379-1385.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005).** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En John M. Walker (ed.): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607.
- Gehring CA, Irving HR (2003).** Natriuretic peptides—a class of heterologous molecules in plants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:1318-1322.
- Genin S, Boucher CA (1994).** A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol. Gen. Genet.* 243:112-118.
- Genin S, Gough CL, Zischek C, Boucher CA (1992).** Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 6:3065-3076.
- Gómez-Gómez L, Boller T (2002).** Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7:251-256.
- Gottig N, Garavaglia BS, Daurelio LD, Valentine A, Gehring C, Orellano EG, Ottado J (2008).** *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:18631-18636.

- Gottig N, Garavaglia BS, Daurelio LD, Valentine A, Gehring C, Orellano EG, Ottado J (2009b).** Modulating host homeostasis as a strategy in the plant-pathogen arms race. *Commun. Integr. Biol.* 2:89-90.
- Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, Ottado J (2009a).** A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One* 4(2):e4358. doi:10.1371/journal.pone.0004358.
- Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Zimaro T, Sgro G, Ficarra FA, Dunger G, Daurelio LD, Thomas L, Gehring C, Orellano EG, Ottado J (2010).** Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Méndez Vilas (Ed.). Formatex Research Center. 1:196-204.
- Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS (2002).** Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010).** A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nuc. Acids Res.* 38(Web Server issue):W695-699.
- Graham JH, Gottwald TR (1991).** Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Florida. *Plant Dis.* 75:1193-1200.
- Graham JH, Gottwald TR, Civerolo EL, McGuire RG (1989).** Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Dis.* 73:423-427.
- Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS (2004).** *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pathol.* 5:1-15.
- Graham JH, Gottwald TR, Fardelmann D (1990a).** Cultivar-specific interactions for strains of *Xanthomonas campestris* from Florida that cause citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Dis.* 74:753-756.
- Graham JH, Hartung JS, Stall RE, Chase AR (1990b).** Pathological, restriction-fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. *Phytopathology* 80:820-836.
- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL (2006).** Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:425-449.
- Greenberg JT (1996).** Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:12094-12097.
- Greenberg JT, Yao N (2004).** The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6:201-211.
- Grimm C, Panopoulos NJ (1989).** The predicted protein product of a pathogenicity locus from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is homologous to a highly conserved domain of several prokaryotic regulatory proteins. *J. Bacteriol.* 171:5031-5038.
- Grodberg J, Dunn JJ (1988).** *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170:1245-1253.

- Gu K, Tian D, Yang F, Wu L, Sreekala C, Wang D, Wang GL, Yin Z (2004).** High-resolution genetic mapping of *Xa27(t)*, a new bacterial blight resistance gene in rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 108:800-807.
- Guex N, Peitsch MC (1997).** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- Guo Y, Figueiredo F, Jones J, Wang N (2011).** HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:649-661.
- Hacker J, Kaper JB (2000).** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:641-679.
- Hadacek F, Bachmann G, Engelmeier D, Chobot V (2011).** Hormesis and a Chemical Raison D'être for Secondary Plant Metabolites. *Dose-Response* 9:79-116.
- Hajri A, Brin C, Hunault G, Lardeux F, Lemaire C, Manceau C, Boureau T, Poussier S (2009).** A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* 4(8): e6632. doi:10.1371/journal.pone.0006632.
- Hammond-Kosack K, Jones JDG (2000).** Responses to plant pathogens. En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (Buchanan B, Gruissem W, Jones R, Eds., 2000) Cap. 21:1102-1156. American Society of Plant Physiologist.
- Hayward AC (1993).** The host of *Xanthomonas*. En *Xanthomonas*. (Swings JG, Civerolo EL, Eds.) 1-17. Chapman and Hall, London.
- He SY, Huang HC, Collmer A (1993).** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PS}: A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255-1266.
- He SY, Nomura K, Whittam TS (2004).** Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1694:181-206.
- Henrichsen J (1972).** Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36:478-503.
- Hodak H, Clantin B, Willery E, Villeret V, Loch C, Jacob-Dubuisson F (2006).** Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol. Microbiol.* 61:368-382.
- Hong E, Lee HM, Ko H, Kim DU, Jeon BY, Jung J, Shin J, Lee SA, Kim Y, Jeon YH, Cheong C, Cho HS, Lee W (2007).** Structure of an atypical orphan response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *J. Biol. Chem.* 282:20667-20675.
- Hu NT, Hung MN, Chiou SJ, Tang F, Chiang DC, Huang HY, Wu CY (1992).** Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* 174:2679-2687.
- Huang KJ, Igo MM (1996).** Identification of the bases in the *ompF* regulatory region, which interact with the transcription factor OmpR. *J. Mol. Biol.* 262:615-628.

- Hueck CJ (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:379-433.
- Ielpi L, Couso RO, Dankert MA (1993).** Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 175:2490-2500.
- Ingle RA, Carstens M, Denby KJ (2006).** PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays* 28:880-889.
- Innes RW (2004).** Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant Physiol.* 135:695-701.
- Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guédin S, Willery E, Molle G, Locht C (1999).** Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 274:37731-37735.
- Jacob-Dubuisson F, Locht C, Antoine R (2001).** Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* 40:306-313.
- Jarvis P, Chen LJ, Li H, Peto CA, Fankhauser C, Chory J (1998).** An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* 282:100-103.
- Jenkins CL, Starr MP (1982).** The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Curr. Microbiol.* 7:323-326.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000).** Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19:4004-4014.
- Jiang W, Jiang BL, Xu RQ, Huang JD, Wei HY, Jiang GF, Cen WJ, Liu J, Ge YY, Li GH, Su LL, Hang XH, Tang DJ, Lu GT, Feng JX, He YQ, Tang JL (2009).** Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:1401-1411.
- Jin Q, Hu W, Brown I, McGhee G, Hart P, Jones AL, He SY (2001).** Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 40:1129-1139.
- Jones JD, Dangl JL (2006).** The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schütze K, Chaban C, Holt BF III, Merkle T, Schäfer E, Harter K, Dangl JL (2006).** bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J.* 25:4400-4411.
- Kato N, Tsuzuki M, Aiba H, Mizuno T (1995).** Gene activation by the *Escherichia coli* positive regulator OmpR: a mutational study of the DNA-binding domain of OmpR. *Mol. Gen. Genet.* 248:399-406.
- Katzen F, Becker A, Ielmini MV, Oddo CG, Ielpi L (1999).** New mobilizable vectors suitable for gene replacement in gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:278-282.

- Katzen F, Becker A, Zorreguieta A, Pühler A, Ielpi L (1996).** Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. J. Bacteriol. 178:4313-4318.
- Katzen F, Ferreira DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Pühler A, Ielpi L (1998).** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. J. Bacteriol. 180:1607-1617.
- Kearns DB (2010).** A field guide to bacterial swarming motility. Nat. Rev. Microbiol. 8:634-644.
- Kemp BP, Horne J, Bryant A, Cooper RM (2004).** *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). Physiol. Molec. Plant Pathol. 64:209-218.
- Kenney LJ (2002).** Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. Curr. Opin. Microbiol. 5:135-141.
- Kenney LJ, Bauer MD, Silhavy TJ (1995).** Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:8866-8870.
- Kidd KK, Ruano G (1995).** Optimizing PCR. En PCR 2. A Practical Approach (Mc Pherson MJ, Hames BD, Taylor GR, eds.). Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009).** The SWISS-MODEL Repository and associated resources. Nuc. Acids Res. 37:D387-D392.
- Kim JG, Park BK, Yoo CH, Jeon E, Oh J, Hwang I (2003).** Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. J. Bacteriol. 185:3155-3166.
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D (2005).** Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. Cell 121:749-759.
- Kim YS, Jung HC, Pan JG (2000).** Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. Appl. Environ. Microbiol. 66:788-793.
- King-Scott J, Nowak E, Mylonas E, Panjekar S, Roessle M, Svergun DI, Tucker PA (2007).** The structure of a full-length response regulator from *Mycobacterium tuberculosis* in a stabilized three-dimensional domain-swapped, activated state. J. Biol. Chem. 282:37717-37729.
- Kobe B, Deisenhofer J (1995).** Proteins with leucine-rich repeats. Curr. Opin. Struct. Biol. 5:409-416.
- Kobe B, Kajava AV (2001).** The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr. Opin. Struct. Biol. 11:725-732.
- Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, Bonas U (2006).** Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. J. Bacteriol. 188:7652-7660.
- Koizumi M (1977).** Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. Proc. Intern. Soc. Citric 3:924-928.

- Koncz C, Schell J (1986).** The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396.
- Kondo H, Nakagawa A, Nishihira J, Nishimura Y, Mizuno T, Tanaka I (1997).** *Escherichia coli* positive regulator OmpR has a large loop structure at the putative RNA polymerase interaction site. *Nat. Struct. Biol.* 4:28-31.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM II, Peterson KM (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.
- Krause K, Krupinska K (2009).** Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends Plant Sci.* 14:194-199.
- Kvitko BH, Park DH, Velásquez AC, Wei CF, Russell AB, Martin GB, Schneider DJ, Collmer A (2009).** Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog.* 5(4):e1000388. doi:10.1371/journal.ppat.1000388.
- Kvitko BH, Ramos AR, Morello JE, Oh HS, Collmer A (2007).** Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J. Bacteriol.* 189:8059-8072.
- Kwan EM, Boraston AB, McLean BW, Kilburn DG, Warren RA (2005).** N-Glycosidase-carbohydrate-binding module fusion proteins as immobilized enzymes for protein deglycosylation. *Protein Eng. Des. Sel.* 18:497-501.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laia ML, Moreira LM, Dezajacomo J, Brigati JB, Ferreira CB, Ferro MI, Silva AC, Ferro JA, Oliveira JC (2009).** New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. *BMC Microbiol.* 9:12.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001).** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853.
- Lan CY, Igo MM (1998).** Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J. Bacteriol.* 180:171-174.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007).** ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lawson RH, Dienelt MM, Civerolo EL (1989).** Histology of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia*: light and scanning electron microscopy. *Phytopathology* 79:329-335.
- Lee AK, Detweiler CS, Falkow S (2000).** OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* 182:771-781.
- Lee BM, Park YJ, Park DS, Kang HW, Kim JG, Song ES, Park IC, Yoon UH, Hahn JH, Koo BS, Lee GB, Kim H, Park HS, Yoon KO, Kim JH, Jung CH, Koh NH, Seo JS, Go SJ (2005b).** The

- genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33:577-586.
- Lee SW, Jeong KS, Han SW, Lee SE, Phee BK, Hahn TR, Ronald P (2008).** The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, hrpG expression, and virulence. *J. Bacteriol.* 190:2183-2197.
- Lee VT, Schneewind O (2001).** Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* 15:1725-1752.
- Lee YH, Kolade OO, Nomura K, Arvidson DN, He SY (2005a).** Use of dominant-negative HrpA mutants to dissect Hrp pilus assembly and type III secretion in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Biol. Chem.* 280:21409-21417.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1985).** Principios de bioquímica. 2ª ed. Ed. Omega S.A., Barcelona, España.
- Leyns F, De Cleene M, Swings J, De Ley J (1984).** The host range of *Xanthomonas*. *Bot. Rev.* 50:308-356.
- Lichtenthaler HK (1987).** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Lin SS, Manchester JK, Gordon JI (2003).** Sip2, an *N*-myristoylated β subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. *J. Biol. Chem.* 278:13390-13397.
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ (1986).** Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168:512-522.
- Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, Eberl L, Molin S, Givskov M (1998).** *N*-Acyl-*L*-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 180:6384-6388.
- Liu Y, Eisenberg D (2002).** 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci.* 11:1285-1299.
- Lorenz C, Büttner D (2009).** Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 191:1414-1428.
- Lorenz C, Büttner D (2011).** Secretion of early and late substrates of the type III secretion system from *Xanthomonas* is controlled by HpaC and the C-terminal domain of HrcU. *Mol. Microbiol.* 79:447-67.
- Lorenz C, Schulz S, Wolsch T, Rossier O, Bonas U, Büttner D (2008).** HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog.* 4(6):e1000094. doi:10.1371/journal.ppat.1000094.
- Ludidi N, Morse M, Sayed M, Wherrett T, Shabala S, Gehring C (2004).** A recombinant plant natriuretic peptide causes rapid and spatially differentiated K^+ , Na^+ and H^+ flux changes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell Physiol.* 45:1093-1098.
- Lukasik E, Takken FL (2009).** STANDing strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:427-436.

- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL (2003).** *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112:379-389.
- Mackey D, Holt BF III, Wiig A, Dangl JL (2002).** RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-754.
- Macnab RM, Parkinson JS (1991).** Genetic analysis of the bacterial flagellum. *Trends Genet.* 7:196-200.
- Makino K, Amemura M, Kawamoto T, Kimura S, Shinagawa H, Nakata A, Suzuki M (1996).** DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 259:15-26.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Tasneem A, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Bryant SH (2009).** CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nuc. Acids Res.* 37(Database issue):D205-210.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004).** CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nuc. Acids Res.* 32(Web Server issue):W327-331.
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH (2011).** CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nuc. Acids Res.* 39(Database issue):D225-229.
- Maris AE, Sawaya MR, Kaczor-Grzeskowiak M, Jarvis MR, Bearson SM, Kopka ML, Schröder I, Gunsalus RP, Dickerson RE (2002).** Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat. Struct. Biol.* 9:771-778.
- Martínez-Hackert E, Stock AM (1997a).** The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure* 5:109-124.
- Martínez-Hackert E, Stock AM (1997b).** Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* 269:301-312.
- Mehta A, Rosato YB (2003).** A simple method for in vivo expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Curr. Microbiol.* 47:400-403.
- Meier S, Bastian R, Donaldson L, Murray S, Bajic V, Gehring C (2008).** Co-expression and promoter content analyses assign a role in biotic and abiotic stress responses to plant natriuretic peptides. *BMC Plant Biol.* 8:24.
- Miller WG, Leveau JH, Lindow SE (2000).** Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1243-1250.
- Minamino T, Namba K (2004).** Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7:5-17.

- Mizuno T, Kato M, Jo YL, Mizushima S (1988).** Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated *ompC* and *ompF* genes of *Escherichia coli*. Studies with wild-type and mutant OmpR proteins. *J. Biol. Chem.* 263:1008-1012.
- Monds RD, O'Toole GA (2009).** The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 17:73-87.
- Moreira LM, Almeida NF Jr, Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, da Silva AC, da Silva AM, de Moraes FE, de Oliveira JC, de Souza RF, Facincani AP, Ferraz AL, Ferro MI, Furlan LR, Gimenez DF, Jones JB, Kitajima EW, Laia ML, Leite RP Jr, Nishiyama MY, Rodrigues Neto J, Nociti LA, Norman DJ, Ostroski EH, Pereira HA Jr, Staskawicz BJ, Tezza RI, Ferro JA, Vinatzer BA, Setubal JC (2010b).** Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* 11:238.
- Moreira LM, de Laia ML, de Souza RF, Zaini PA, da Silva AC, da Silva AM, Ferro JA (2010a).** Development and validation of a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* DNA microarray platform (*XACarray*) generated from the shotgun libraries previously used in the sequencing of this bacterial genome. *BMC Res. Notes* 3:150.
- Moreira LM, de Souza RF, Almeida NF Jr, Setubal JC, Oliveira JC, Furlan LR, Ferro JA, da Silva AC (2004).** Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:163-184.
- Mudgett MB (2005).** New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:509-531.
- Münch R, Hiller K, Grote A, Scheer M, Klein J, Schobert M, Jahn D (2005).** Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* 21:4187-4189.
- Mysore KS, Ryu CM (2004).** Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* 9:97-104.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006).** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312:436-439.
- Nembaware V, Seoighe C, Sayed M, Gehring C (2004).** A plant natriuretic peptide-like gene in the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* may induce hyper-hydration in the plant host: a hypothesis of molecular mimicry. *BMC Evol. Biol.* 4:10.
- Nimchuk ZL, Fisher EJ, Desveaux D, Chang JH, Dangl JL (2007).** The HopX (AvrPphE) family of *Pseudomonas syringae* type III effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:346-357.
- Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U (2001).** cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* 41:1271-1281.
- Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U (2002).** Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.* 184:1340-1348.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004).** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198:249-266.

- Ochiai H, Inoue Y, Takeya M, Sasaki A, Kaku H (2005).** Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *Jpn. Agr. Res. Q.* 39:275-287.
- Oh SK, Lee S, Chung E, Park JM, Yu SH, Ryu CM, Choi D (2006).** Insight into Types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. *Planta* 223:1101-1107.
- Padmanabhan M, Cournoyer P, Dinesh-Kumar SP (2009).** The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cell. Microbiol.* 11:191-198.
- Parish T, Smith DA, Roberts G, Betts J, Stoker NG (2003).** The *senX3-regX3* two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. *Microbiology* 149:1423-1435.
- Park JM, Paek KH (2007).** Recognition and response in plant-pathogen interactions. *J. Plant Biol.* 50:132-138.
- Partida-Martínez LP, Heil M (2011).** The microbe-free plant: fact or artifact? *Front. Plant Sci.* 2:100.
- Pazour GJ, Ta CN, Das A (1992).** Constitutive mutations of *Agrobacterium tumefaciens* transcriptional activator *virG*. *J. Bacteriol.* 174:4169-4174.
- Peitsch MC (1995).** Protein modeling by E-mail. *Nat. Biotechnol.* 13:658-660.
- Plummer TH Jr, Elder JH, Alexander S, Phelan AW, Tarentino AL (1984).** Demonstration of peptide:*N*-glycosidase F activity in endo- β -*N*-acetylglucosaminidase F preparations. *J. Biol. Chem.* 259:10700-10704.
- Pozidis C, Chalkiadaki A, Gomez-Serrano A, Stahlberg H, Brown I, Tampakaki AP, Lustig A, Sianidis G, Politou AS, Engel A, Panopoulos NJ, Mansfield J, Pugsley AP, Karamanou S, Economou A (2003).** Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.* 278:25816-25824.
- Pratt LA, Silhavy TJ (1994).** OmpR mutants specifically defective for transcriptional activation. *J. Mol. Biol.* 243:579-594.
- Preston GM, Studholme DJ, Caldelari I (2005).** Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:331-360.
- Pugsley AP (1993).** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
- Qian W, Han ZJ, He C (2008a).** Two-component signal transduction systems of *Xanthomonas* spp.: a lesson from genomics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:151-161.
- Qian W, Han ZJ, Tao J, He C (2008b).** Genome-scale mutagenesis and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:1128-1138.
- Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H, Wu W, Hao P, Wang L, Jiang BL, Zeng S, Gu WY, Lu G, Rong L, Tian Y, Yao Z, Fu G, Chen B, Fang R, Qiang B, Chen Z, Zhao GP, Tang JL, He C (2005).** Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15:757-767.

- Rademaker JL, Louws FJ, Schultz MH, Rossbach U, Vauterin L, Swings J, de Bruijn FJ (2005).** A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95:1098-1111.
- Rahme LG, Mindrinis MN, Panopoulos NJ (1992).** Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 174:3499-3507.
- Rajagopal L, Sundari CS, Balasubramanian D, Sonti RV (1997).** The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.* 415:125-128.
- Rampersaud A, Harlocker SL, Inouye M (1994).** The OmpR protein of *Escherichia coli* binds to sites in the *ompF* promoter region in a hierarchical manner determined by its degree of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269:12559-12566.
- Rausher MD (2001).** Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411:857-864.
- Reece KS, Phillips GJ (1995).** New plasmids carrying antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 165:141-142.
- Reese MG (2000).** Computational prediction of gene structure and regulation in the genome of *Drosophila melanogaster*. PhD Thesis (PDF), UC Berkeley-University of Hohenheim.
- Reese MG (2001).** Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* 26:51-56.
- Rhee JE, Sheng W, Morgan LK, Nolet R, Liao X, Kenney LJ (2008).** Amino acids important for DNA recognition by the response regulator OmpR. *J. Biol. Chem.* 283:8664-8677.
- Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendín L, Filippone P, Torres PS, Qüesta J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA, Marano MR (2007).** Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1222-1230.
- Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiäho-Lassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY (1997).** Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3459-3464.
- Rossier O, Van den Ackerveken G, Bonas U (2000).** HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol. Microbiol.* 38:828-838.
- Rousseau F, Schymkowitz JW, Itzhaki LS (2003).** The unfolding story of three-dimensional domain swapping. *Structure* 11:243-251.
- Russo FD, Slauch JM, Silhavy TJ (1993).** Mutations that affect separate functions of OmpR the phosphorylated regulator of porin transcription in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 231:261-273.
- Rybak M, Minsavage GV, Stall RE, Jones JB (2009).** Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. *Mol. Plant. Pathol.* 10:249-262.
- Salzberg SL, Sommer DD, Schatz MC, Phillippy AM, Rabinowicz PD, Tsuge S, Furutani A, Ochiai H, Delcher AL, Kelley D, Madupu R, Puiu D, Radune D, Shumway M, Trapnell C,**

- Aparna G, Jha G, Pandey A, Patil PB, Ishihara H, Meyer DF, Szurek B, Verdier V, Koebnik R, Dow JM, Ryan RP, Hirata H, Tsuyumu S, Won Lee S, Seo YS, Sriariyanum M, Ronald PC, Sonti RV, Van Sluys MA, Leach JE, White FF, Bogdanove AJ (2008).** Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics* 9:204.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989).** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2^o Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaad NW, Vidaver AK, Lacy GH, Rudolph K, Jones JB (2000).** Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. *Phytopathology* 90:208-213.
- Schöning JC, Streitner C, Page DR, Hennig S, Uchida K, Wolf E, Furuya M, Staiger D (2007).** Auto-regulation of the circadian slave oscillator component *AtGRP7* and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *Plant J.* 52:1119-1130.
- Schulte R, Bonas U (1992a).** A *Xanthomonas* Pathogenicity Locus Is Induced by Sucrose and Sulfur-Containing Amino Acids. *Plant Cell* 4:79-86.
- Schulte R, Bonas U (1992b).** Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* 174:815-823.
- Schulz S, Büttner D (2011).** Functional characterization of the type III secretion substrate specificity switch protein HpaC from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Infect. Immun.* 79:2998-3011.
- Schulze-Lefert P (2004).** Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr. Biol.* 14:R22-R24.
- Schwacke R, Fischer K, Ketelsen B, Krupinska K, Krause K (2007).** Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Mol. Genet. Genomics* 277:631-646.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003).** SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nuc. Acids Res.* 31:3381-3385.
- Schwessinger B, Zipfel C (2008).** News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:389-395.
- Sedmak JJ, Grossberg SE (1977).** A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79:544-552.
- Sgro GG, Ficarra FA, Dunger G, Scarpeci TE, Valle EM, Cortadi A, Orellano EG, Gottig N, Ottado J (2012).** Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to pathogen virulence. *Mol. Plant Pathol.* 13:1047-1059.
- Shao F, Golstein C, Ade J, Stoutemyer M, Dixon JE, Innes RW (2003).** Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301:1230-1233.
- Sharif TR, Igo MM (1993).** Mutations in the alpha subunit of RNA polymerase that affect the regulation of porin gene transcription in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 175:5460-5468.

- Shiotani H, Fujikawa T, Ishihara H, Tsuyumu S, Ozaki K (2007).** A *pthA* homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. J. Bacteriol. 189:3271-3279.
- Shirasu K, Schulze-Lefert P (2003).** Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. Trends Plant Sci. 8:252-258.
- Slauch JM, Russo FD, Silhavy TJ (1991).** Suppressor mutations in *rpoA* suggest that OmpR controls transcription by direct interaction with the α subunit of RNA polymerase. J. Bacteriol. 173:7501-7510.
- Stall RE, Marcó CM, Canteros BI (1982).** Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to canker of *Citrus*. Phytopathology 72:1097-1100.
- Stall RE, Miller JW, Marcó CM, Canteros BI (1980).** Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. Proc. Fl. State Hort. Soc. 93:10-14.
- Starr MP (1981).** The genus *Xanthomonas*. The Prokaryotes (Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG, eds.), 742-763. Springer Verlag, Berlin.
- Starr MP, Stephens WL (1964).** Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. J. Bacteriol. 87:293-302.
- Steinberger EM, Beer SV (1988).** Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. Mol. Plant-Microbe Interact. 1:135-144.
- Stuurman N, Pacios Bras C, Schlaman HR, Wijfjes AH, Bloemberg G, Spaik HP (2000).** Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:1163-1169.
- Suzuki T (2005).** A simple, sensitive in vitro assay for cytoplasmic deglycosylation by peptide:N-glycanase. Methods 35:360-365.
- Suzuki T, Park H, Kitajima K, Lennarz WJ (1998).** Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide:N-glycanase activity. J. Biol. Chem. 273:21526-21530.
- Suzuki T, Park H, Lennarz WJ (2002).** Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. FASEB J. 16:635-641.
- Swarup S, de Feyter R, Brlansky RH, Gabriel DW (1991).** A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker lesions on citrus. Phytopathology 81:802-809.
- Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, Gabriel DW (1992).** An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:204-213.
- Takahashi N, Nishibe H (1978).** Some characteristics of a new glycopeptidase acting on aspartylglycosylamine linkages. J. Biochem. 84:1467-1473.
- Takken FL, Albrecht M, Tameling WI (2006).** Resistance proteins: molecular switches of plant defence. Curr. Opin. Plant Biol. 9:383-390.

- Tameling WI, Vossen JH, Albrecht M, Lengauer T, Berden JA, Haring MA, Cornelissen BJ, Takken FL (2006).** Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. *Plant Physiol.* 140:1233-1245.
- Tameling WIL, Takken FLW (2008).** Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:243-255.
- Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M (2004).** Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.* 6:805-816.
- Tang JL, Liu YN, Barber CE, Dow JM, Wootton JC, Daniels MJ (1991).** Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 226:409-417.
- Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB (1996).** Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science* 274:2060-2063.
- Tang X, Xiao Y, Zhou JM (2006).** Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1159-1166.
- Taylor BL, Zhulin IB (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:479-506.
- Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klöggen U, Patschkowski T, Rückert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter FJ, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O (2005).** Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* 187:7254-7266.
- Thieme F, Szczesny R, Urban A, Kirchner O, Hause G, Bonas U (2007).** New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved *N*-myristoylation motif. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1250-1261.
- Thomma BP, Nürnberger T, Joosten MH (2011).** Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23:4-15.
- Thowthampitak J, Shaffer BT, Prathuangwong S, Loper JE (2008).** Role of *rpfF* in virulence and exoenzyme production of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the causal agent of bacterial pustule of soybean. *Phytopathology* 98:1252-1260.
- Torres PS, Malamud F, Rigano LA, Russo DM, Marano MR, Castagnaro AP, Zorreguieta A, Bouarab K, Dow JM, Vojnov AA (2007).** Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ. Microbiol.* 9:2101-2109.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354.

- Tsuge S, Nakayama T, Terashima S, Ochiai H, Furutani A, Oku T, Tsuno K, Kubo Y, Kaku H (2006).** Gene involved in transcriptional activation of the *hrp* regulatory gene *hrpG* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. J. Bacteriol. 188:4158-4162.
- van Alphen W, Lugtenberg B (1977).** Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 131:623-630.
- van der Biezen EA, Jones JD (1998a).** Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends Biochem. Sci. 23:454-456.
- van der Biezen EA, Jones JD (1998b).** The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. Curr. Biol. 8:R226-R227.
- van der Hoorn RA, Kamoun S (2008).** From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. Plant Cell 20:2009-2017.
- Van Gijsegem F, Vasse J, Camus JC, Marena M, Boucher C (2000).** *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. Mol. Microbiol. 36:249-260.
- Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Menck CF, da Silva AC, Ferro JA, Oliveira MC, Setubal JC, Kitajima JP, Simpson AJ (2002).** Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 40:169-189.
- Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C, Brito B (2000).** The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:259-267.
- Vauterin L, Rademaker J, Swings J (2000).** Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677-682.
- Vikis HG, Guan KL (2004).** Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. En Protein-Protein Interactions. Methods and Applications. 261:175-186. Ed. Fu, H. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Volz K, Matsumura P (1991).** Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7 Å resolution. J. Biol. Chem. 266:15511-15519.
- Vorhölter FJ, Schneiker S, Goesmann A, Krause L, Bekel T, Kaiser O, Linke B, Patschkowski T, Rückert C, Schmid J, Sidhu VK, Sieber V, Tauch A, Watt SA, Weisshaar B, Becker A, Niehaus K, Pühler A (2008).** The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. J. Biotechnol. 134:33-45.
- Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF, Filloux A (2001).** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. EMBO J. 20:6735-6741.
- Wang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen L, Pi LY, Zhang S, Zhang Z, Fauquet C, Gaut BS, Whalen MC, Ronald PC (1998).** Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. Plant Cell 10:765-779.
- Ward DV, Draper O, Zupan JR, Zambryski PC (2002).** Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:11493-11500.

- Warren RF, Merritt PM, Holub E, Innes RW (1999).** Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* 152:401-412.
- Weber E, Koebnik R (2005).** Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 187:6175-6186.
- Weber E, Ojanen-Reuhs T, Huguet E, Hause G, Romantschuk M, Korhonen TK, Bonas U, Koebnik R (2005).** The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.* 187:2458-2468.
- Wei K, Tang DJ, He YQ, Feng JX, Jiang BL, Lu GT, Chen B, Tang JL (2007).** *hpaR*, a putative *marR* family transcriptional regulator, is positively controlled by HrpG and HrpX and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *J. Bacteriol.* 189:2055-2062.
- Wei Z, Kim JF, Beer SV (2000).** Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1251-1262.
- Wei ZM, Beer SV (1995).** *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of σ factors. *J. Bacteriol.* 177:6201-6210.
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992).** Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88.
- Weiner MP, Anderson C, Jerpseth B, Wells S, Johnson-Browne B, Vaillancourt P (1994).** Studier pET system vectors and hosts. *Strategies* 7:41-43.
- Wengelnik K, Bonas U (1996).** HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 178:3462-3469.
- Wengelnik K, Marie C, Russel M, Bonas U (1996a).** Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* 178:1061-1069.
- Wengelnik K, Rossier O, Bonas U (1999).** Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J. Bacteriol.* 181:6828-6831.
- Wengelnik K, Van den Ackerveken G, Bonas U (1996b).** HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:704-712.
- White FF, Potnis N, Jones JB, Koebnik R (2009).** The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol. Plant Pathol.* 10:749-766.
- Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL (1996).** The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84:769-779.

- Wu L, Goh ML, Sreekala C, Yin Z (2008).** XA27 depends on an amino-terminal signal-anchor-like sequence to localize to the apoplast for resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiol.* 148:1497-1509.
- Wu Y, Li Q, Chen XZ (2007).** Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat. Protoc.* 2:3278-3284.
- Xiao Y, Heu S, Yi J, Lu Y, Hutcheson SW (1994).** Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J. Bacteriol.* 176:1025-1036.
- Yamazaki A, Hirata H, Tsuyumu S (2008a).** HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Gen. Plant Pathol.* 74:138-150.
- Yamazaki A, Hirata H, Tsuyumu S (2008b).** Type III regulators HrpG and HrpXct control synthesis of α -amylase, which is involved in *in planta* multiplication of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Gen. Plant Pathol.* 74:254-257.
- Yang Y, Gabriel DW (1995).** *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:627-631.
- Yang Y, Shah J, Klessig DF (1997).** Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1639.
- Yanish-Perron C, Vieira J, Messing J (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Yoshida T, Qin L, Egger LA, Inouye M (2006).** Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR. *J. Biol. Chem.* 281:17114-17123.
- Zhang J, Zhou JM (2010).** Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol. Plant* 3:783-793.
- Zhang SS, He YQ, Xu LM, Chen BW, Jiang BL, Liao J, Cao JR, Liu D, Huang YQ, Liang XX, Tang DJ, Lu GT, Tang JL (2008).** A putative *colR_{XC1049}-colS_{XC1050}* two-component signal transduction system in *Xanthomonas campestris* positively regulates *hrpC* and *hrpE* operons and is involved in virulence, the hypersensitive response and tolerance to various stresses. *Res. Microbiol.* 159:569-578.
- Zhang Y, Callaway EM, Jones JB, Wilson M (2009).** Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *Eur. J. Plant Pathol.* 124:379-390.
- Zhu JK (2002).** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:247-273.
- Zhu W, MaGbanua MM, White FF (2000).** Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 182:1844-1853.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T (2004).** Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764-767.