

Contato letal

Estrutura em forma de agulha permite à bactéria *Xanthomonas citri* lançar compostos tóxicos sobre microrganismos competidores

Ricardo Zorzetto

A bactéria *Xanthomonas citri*, causadora do cancro cítrico, doença que voltou a se alastrar pelas plantações paulistas, passa apenas parte de sua vida no interior das folhas e dos frutos de laranjeiras e limoeiros. Ali, protegida e com fartura de alimento, ela se multiplica e estimula a proliferação das células vegetais, gerando lesões salientes e escurecidas que, ao se romperem, a devolvem ao ambiente. Em boa parte do tempo, porém, enfrenta condições bem menos amigáveis. No solo ou na superfície externa das folhas, onde em geral é encontrada, a competição com outros microrganismos por espaço e nutrientes é acirrada. Mesmo assim, a *Xanthomonas citri* costuma se sair bem, como comprovam os laranjais da Flórida, nos Estados Unidos, onde a produção caiu à metade nos últimos anos com a disseminação do cancro cítrico e de outra doença, o *greening*.

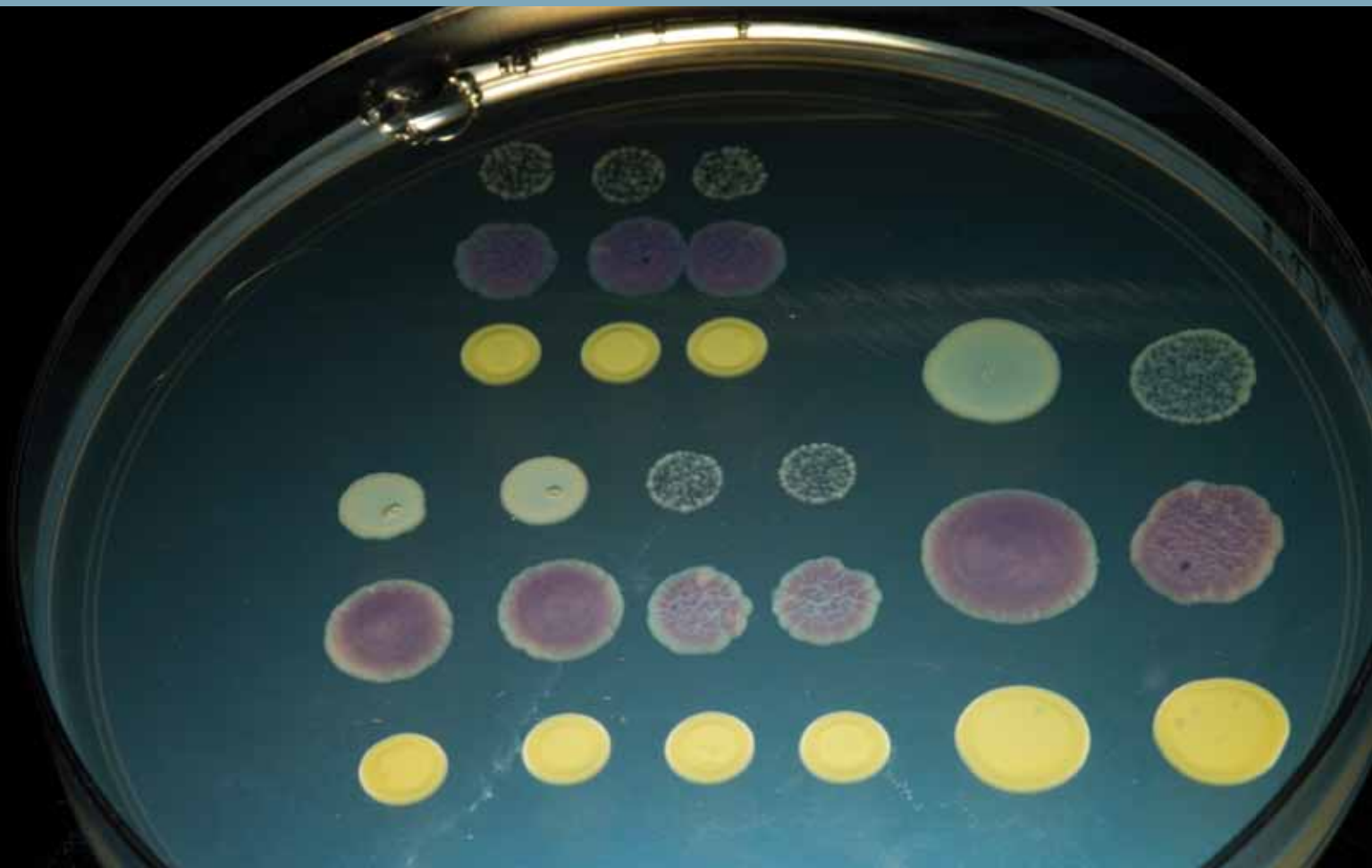
Milhares de anos de evolução prepararam a bactéria para lidar com os potenciais concorrentes. Sua célula em for-

ma de bastão é recoberta de filamentos ultrafinos que lembram pelos delgados. Essas estruturas são parte de um mecanismo de defesa que destrói outras bactérias. O bioquímico Shaker Chuck Farah e sua equipe no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) demonstraram que, por meio de um tipo específico desses filamentos, a *X. citri* lança um coquetel de compostos tóxicos sobre seus potenciais concorrentes.

Os filamentos que lembram pelos na realidade são canais – há ao menos seis tipos conhecidos – que conectam o meio interno da bactéria com o exterior. Uma variedade específica desses canais, o chamado sistema de secreção do tipo IV (T4SS, na sigla inglês), é composta por mais de uma centena de proteínas e tem a forma de uma agulha. Já se sabia que, por meio dela, muitas espécies de bactérias trocam material genético com outras bactérias da mesma ou de outras espécies – fenômeno conhecido como conjugação, que permite a transferência horizontal de genes, associado ao desenvolvimento de resistência a antibióticos.

Pelo menos uma bactéria, *Agrobacterium tumefaciens*, transfere DNA por meio do T4SS para o seu hospedeiro, uma planta, na qual causa tumores conhecidos como galhas. É também por meio desse sistema de secreção que algumas espécies associadas a doenças em animais e seres humanos injetam proteínas que as ajudam a colonizar o hospedeiro. Mas não se conhecia a função do T4SS na *Xanthomonas citri* e nas dezenas de espécies que integram a família Xanthomonadaceae, da qual fazem parte as bactérias do gênero *Stenotrophomonas* – entre elas, a espécie *S. maltophilia*, um patógeno oportunista em seres humanos.

Estudos anteriores indicavam que na família Xanthomonadaceae os canais T4SS eram diferentes dos encontrados em outros grupos de bactérias. Farah e sua equipe também já haviam constatado que, no caso da *Xanthomonas citri*, essa estrutura não desempenhava um papel essencial na infecção da planta. Agora os pesquisadores da USP verificaram que nessa bactéria o sistema de secreção IV serve para injetar cerca de uma dezena



de proteínas tóxicas (toxinas) distintas em outras bactérias.

Essas toxinas digerem açúcares, proteínas e lipídios da parede de bactérias competidoras, fazendo-as expulsar seus conteúdos de uma maneira que, ao microscópio, às vezes parece explosiva. No laboratório de Farah, os biólogos Diorge Souza e Gabriel Oka colocaram milhões de células de *X. citri* para conviver com uma quantidade semelhante de *Escherichia coli*, bactéria normalmente encontrada nos intestinos dos mamíferos, e filmaram o que aconteceu. Muitas das vezes em que a *X. citri* tocou a superfície de uma *E. coli* a parede desta se rompeu e seu conteúdo extravasou, como pode se ver em um registro disponível na internet [https://youtu.be/0cSXyd9bd7Q]. “A bactéria fica deformada quando a integridade da sua parede é comprometida”, explica Farah. “É como um balão de festa cheio de água que estoura”, compara.

A secreção de toxinas é ativada pelo contato, embora ainda não se saiba ao certo como a *Xanthomonas* reconhece as bactérias de outras espécies. Ela própria,

Convivência nem sempre pacífica: colônias de *X. citri* (amarelo) cultivadas com colônias de *E. coli* (branco) e *C. violaceum* (rosa)

porém, está protegida dos compostos que produz. Souza e Oka verificaram que a *Xanthomonas* sintetiza antídotos contra suas toxinas. “As antitoxinas estão distribuídas pela parede da *Xanthomonas*”, explica Souza. “Isso provavelmente impede que ela sofra os danos.”

ATRAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS

A propósito, foi uma dessas antitoxinas que anos atrás deu a Souza uma primeira pista sobre o papel do sistema de secreção do tipo IV na *Xanthomonas*. Em 2005, o químico Marcos Alegria, à época aluno de doutorado de Farah, havia publicado um trabalho mostrando que em *X. citri* uma proteína específica – a VirD4 – desse sistema de secreção atraía outras proteínas, todas com função desconhecida na época, para o canal. Uma dessas proteínas, que recebeu a sigla Xac2609,

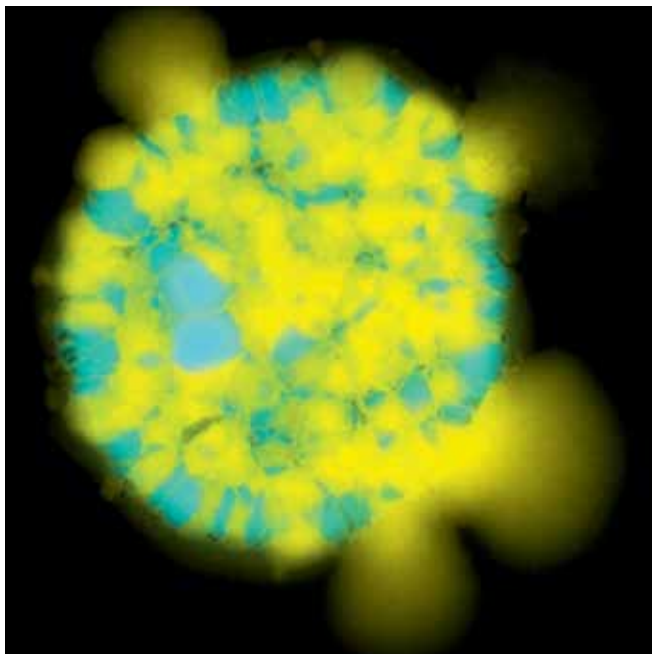
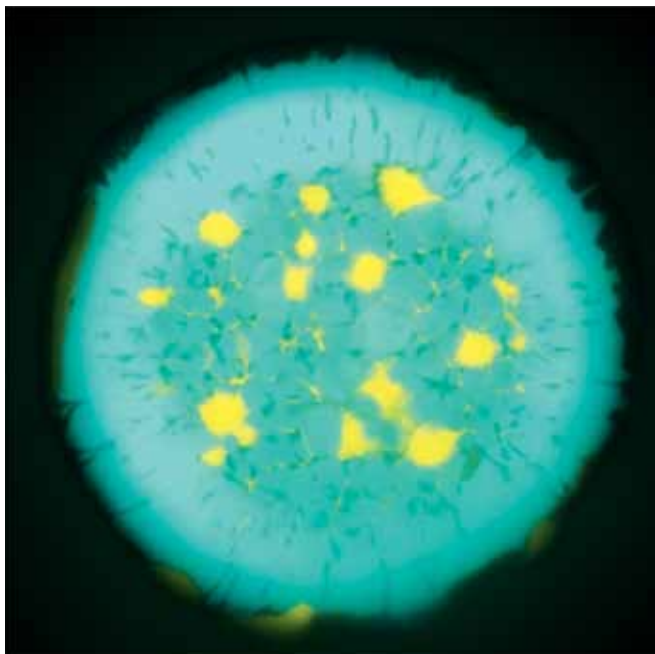
interagiu com a proteína Xac2610, também com função desconhecida. Tempos depois, após determinar a estrutura tridimensional da Xac2610, Souza foi buscar nos bancos de dados públicos outras proteínas com estruturas similares, o que poderia indicar sua função.

A primeira que encontrou foi uma proteína que bloqueia a ação da lisozima e funciona como antitoxina. Esse resultado sugeria que o parceiro de interação da Xac2610, a Xac2609, poderia ser uma lisozima, proteína capaz de digerir a cadeia de açúcares da parede das bactérias. Depois de confirmar a ação dessas duas proteínas, Souza identificou outras potenciais toxinas e antitoxinas – ao todo são 13 do primeiro tipo e 7 do segundo – codificadas no genoma da *Xanthomonas citri*, além de centenas de outras toxinas associadas ao sistema de secreção do tipo IV de outras espécies da família Xanthomonadaceae.

Testes feitos com bactérias de duas espécies diferentes, a *Micrococcus luteus* e a *Bacillus subtilis*, confirmaram que a proteína codificada pelo Xac2609 degra-

Competição em laboratório

Com o sistema de secreção de toxinas íntegro, as bactérias *Xanthomonas citri* (azul) dominam a colônia; sem ele, a *X. citri* fica em desvantagem e perde espaço para a *Escherichia coli* (amarelo)



IMAGENS: DORGE SOUZA / USP

da a parede bacteriana. E que seu efeito é anulado pela Xac2610, segundo artigo publicado em março deste ano na *Nature Communications*. Mas faltava verificar se essa e outras toxinas eram mesmo exportadas pelo sistema de secreção IV. Souza e Oka, então, desenvolveram *X. citri* geneticamente alteradas para não produzir o T4SS e as colocaram para crescer junto com bactérias *E. coli*, que se multiplicam mais rapidamente – a *E. coli* duplica a cada 30 minutos, enquanto a *Xanthomonas citri* gasta até cinco vezes mais tempo.

Sem o canal secretor, a *Xanthomonas* ficou em desvantagem. O experimento começou com números semelhantes das duas espécies e terminou com a *E. coli* dominando a colônia. Mesmo se reproduzindo mais devagar, a *Xanthomonas* voltou a prevalecer, eliminando a concorrente, quando os pesquisadores lhe devolveram a capacidade de produzir o T4SS. “O sistema dá uma vantagem competitiva à *Xanthomonas*”, diz Souza.

Embora a *E. coli* não seja uma concorrente da *Xanthomonas* na natureza, os pesquisadores acreditam que o que viram em laboratório pode valer no campo. Eles repetiram o teste contra outras quatro espécies de bactérias classificadas como Gram-negativas, que, como a *E. coli*,

têm um envelope celular composto por três camadas – duas membranas e um periplasma fortificado, composto por um polímero (peptideoglicano) misto de açúcares e aminoácidos. “Até agora a *Xanthomonas* matou todas”, conta Farah, que começou a estudar a bactéria há quase 15 anos, quando integrou o grupo que sequenciou o genoma da *Xanthomonas*.

AMBIENTE HOSTIL

Farah e sua equipe têm evidências de que a *X. citri* se arma com seu T4SS especialmente quando se encontra na parte externa da folha, ambiente potencialmente mais hostil. “Esse mecanismo deve ajudar a bactéria a se tornar competitiva”, comenta o pesquisador Marcos Antonio Machado, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis. “Em termos tecnológicos, essa constatação abre a possibilidade de que se busquem compostos capazes de inibir o funcionamento desse sistema”, diz o pesquisador, que investiga formas de aumentar a suscetibilidade da *X. citri* a compostos como o oxicloretto de cobre, usado contra o cancro cítrico nos laranjais paulistas.

Farah acredita que compreender melhor o funcionamento do sistema de secreção IV da *Xanthomonas* é impor-

tante para conhecer como bactérias de diferentes espécies competem entre si quando estão num mesmo ambiente e se utilizam dos mesmos recursos. “Essa competição pode ter implicações para a evolução de comportamentos tanto antagônicos quanto cooperativos entre espécies bacterianas”, conta. Esses estudos também podem levar à identificação de novas toxinas e alvos moleculares para drogas com ação antibacteriana. “Estamos usando a *Xanthomonas*”, completa Farah, “para entender funções mais universais das bactérias”. ■

Projeto

Sinalização por c-di-GMP e o sistema de secreção de macromoléculas do tipo IV em *Xanthomonas citri* (nº 2011/07777-5); Modalidade Projeto Temático; Pesquisador responsável Shaker Chuck Farah (IQ-USP); Investimento R\$ 2.146.849,71 (FAPESP – para todo o projeto).

Artigos científicos

SOUZA, D. P. et al. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature Communications*. 6 mar. 2015.

SOUZA, D. P. et al. A component of the Xanthomonadaceae type IV secretion system combines a VirB7 Motif with a no domain found in outer membrane transport proteins. *PLoS Pathogens*. 2011.

ALEGRIA, M. C. et al. 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*. *Journal of Bacteriology*. v. 187, p. 2315-25. 2005.