JOSÉ FREIRE DA SILVA NETO

ESTUDO DO PAPEL DOS FATORES SIGMA ALTERNATIVOS $\sigma^{E} \in \sigma^{N} \text{ DE } Xylella \ fastidiosa$

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

São Paulo 2007 JOSÉ FREIRE DA SILVA NETO

ESTUDO DO PAPEL DOS FATORES SIGMA ALTERNATIVOS $\sigma^{E} \in \sigma^{N}$ DE Xylella fastidiosa

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador(a): Profa. Dra. Marilis do Valle Marques

São Paulo 2007 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

da Silva Neto, José Freire.

Estudo do papel dos fatores sigma alternativos $\sigma^{E} e \sigma^{N}$ de *Xylella fastidiosa* / José Freire da Silva Neto. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Marilis do Valle Marques.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Regulação gênica em bactérias.

Versão do título para o inglês: Role of the alternative sigma factors σ^{E} and σ^{N} in *Xylella fastidiosa*.

Descritores: 1. Microbiologia 2. Biologia molecular 3. Regulação gênica 4. Resposta a estresse em bactérias 5. Fatores sigma 6. *Xylella fastidiosa* I. Marques, Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB171/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	José Freire da Silva Neto.		
Título da Tese:	Estudo do papel dos fatores sigma alternativos σ^{E} e σ^{N} de Xylella fastidiosa .		
Orientador(a):	Marilis do Valle Marques.		
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a///			
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)		
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:		
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:		



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438 e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 103 nas fls. 20 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Marílis do Valle Marques, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "*Estudo dos genes regulados pelos fatores sigma alternativos de xylella fastidiosa*" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): José Freire da Silva Neto, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 24.10.2005.

São Paulo, 24 de outubro de 2005.

-1-

of. Dr. Francisco Carlos Pereir

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira Secretário da CEEA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438 e-mail: cep/@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 207/07, referente ao projeto intitulado *Estudo dos genes regulados pelos fatores sigma alternativos de Xylella fastidiosa*" sob a responsabilidade de José Freire da Silva Neto, foi analisado na presente data pela CEPSH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

São Paulo, 09 de maio de 2007.

Prof. Dr. PAOLÓ M.A ZANOTTO Vice-Coordenador da CEPsh-ICB/USP

Aos meus pais Antônio e Maria das Graças pela superação de tantas dificuldades e pelo apoio constante.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pela excelente orientação desde a iniciação científica, pela confiança em meu trabalho, pelos muitos ensinamentos e pela dedicação e seriedade na formação de seus alunos.

À Profa Dra. Suely Lopes Gomes e Tie Koide pela duradoura e proveitosa colaboração em vários trabalhos.

À Dra. Cecília Mari Abe pela colaboração nos experimentos de microscopia.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck pela utilização do equipamento de RT-PCR quantitativo e aos alunos de seu laboratório.

Aos Professores e alunos do grupo de seminários e aos componentes da banca de qualificação pelas sugestões, em especial à Profa. Dra. Regina Baldini.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia pela estrutura de trabalho e pelo bom convívio.

Aos professores responsáveis pelo laboratório CAGE do Departamento de Bioquímica da USP e às técnicas Denise e Adriana.

Às funcionárias Marlene e Íris pelo apoio técnico, além da amizade.

Aos funcionários do setor de esterilização, em especial ao senhor José, e ao técnico Carlos do biotério.

Às secretárias Alice, Naíde e Ana pela ajuda sempre que foram solicitadas.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos colegas de laboratório, Lígia, Vânia, Valéria, Elza, Zuleta, Ricardo, Heloíse, Letícia, Emerson, Carolina, Valéria Karla, João, André, Rafael e Ynês pelo excelente ambiente de trabalho, pela colaboração e principalmente pela amizade.

Aos meus pais Antônio e Maria das Graças por terem me ensinado o valor do trabalho, da dignidade e do respeito.

Às minhas queridas irmãs Célia, Sueli, Maria e Simone e aos meus irmãos e amigos Francisco, Ronaldo e Marcos.

Aos meus queridos sobrinhos (as) Carolina, Mariana, Gabriel, Mateus, Vítor, Marquinhos, Felipe, Nicoly, Guilherme e Rodrigo.

Aos amigos Anselmo, Mário, Luís, Rogério, Rogério (Mack), Zuleta, Valéria, Elza e Lígia e a todos os amigos por tornarem minha vida mais completa.

A minha querida namorada Vânia pela cumplicidade, carinho, dedicação e por compartilharmos nossos dias de forma tão harmônica e prazerosa.

"Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pequena. Quem quer passar além do Bojador Tem que passar além da dor. Deus ao mar o perigo e abysmo deu, Mas nelle é que se espelhou o céu."

Fernando Pessoa

RESUMO

DA SILVA NETO, J. F. **Estudo do papel dos fatores sigma alternativos** $\sigma^{E} e \sigma^{N}$ **de Xylella fastidiosa.** 2007. 166 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Os fatores sigma correspondem à subunidade dissociável da RNA polimerase de eubactérias. Neste trabalho foi estudado o papel dos fatores σ^{E} (RpoE) e σ^{N} (RpoN) da bactéria fitopatogênica Xylella fastidiosa. Utilizando uma estratégia de mutagênese por recombinação homóloga foram obtidas linhagens mutantes que não expressam $\sigma^{E} \in \sigma^{N}$, como verificado por *immunoblotting*. A linhagem mutante *rpoE* mostrou-se sensível a etanol e a choque térmico e este fenótipo foi complementado em trans. Perfis de expressão gênica global foram determinados por ensaios de microarranjos de DNA, revelando 21 genes com expressão reduzida no mutante *rpoE*, sob condições de choque de calor. Estes genes codificam para proteases e chaperones de periplasma, sistemas de transdução de sinal e proteínas hipotéticas. Ensaios de RT-PCR quantitativo (gRT-PCR) e ensaios de extensão de oligonucleotídeo permitiram validar o padrão de expressão e determinar o início de transcrição de genes selecionados, confirmando sua indução por choque térmico dependente de σ^{E} . Alinhamento dos promotores mapeados revelou uma seqüência consenso semelhante àquela reconhecida por fatores sigma de função extracitoplasmática (ECFs) de outras bactérias. Os níveis da proteína e do mRNA do fator σ^{E} não variaram em resposta a vários estresses. Embora verificada cotranscrição entre os genes rpoE, seu provável anti-sigma e uma protease periplasmática, o fator sigma não mostrou auto-regulação, mas regulou positivamente o gene do anti-sigma em resposta ao choque térmico. Análises de microarranjo de DNA comparando as linhagens J1a12 e rpoN em meio rico indicaram poucos genes diferencialmente expressos. Em particular, o gene pilA (XF2542), que codifica a subunidade estrutural da fímbria tipo IV, teve sua expressão extremamente reduzida, enquanto o operon codificando proteínas da fímbria tipo I teve sua expressão aumentada no mutante rpoN em relação à linhagem J1a12, como confirmado por qRT-PCR. O início de transcrição do gene XF2542 foi determinado e confirmou o promotor σ^{N} predito. Ensaios de microscopia eletrônica de transmissão e ensaios de *twitching motility* revelaram que, provavelmente devido aos parálogos de XF2542, ainda ocorre montagem da fímbria tipo IV no mutante *rpoN*. No entanto, o mutante *rpoN* fez mais biofilme que a linhagem selvagem e apresentou um fenótipo de auto-agregação. Análise por microarranjo de DNA do transcriptoma da linhagem J1a12, submetida à carência total de nitrogênio por 2, 8 e 12 horas, revelou que 448 genes tiveram sua expressão alterada ao longo da série temporal. Comparação do perfil de expressão das linhagens J1a12 e *rpoN*, submetidas a duas horas de carência de nitrogênio, revelou 22 genes diferencialmente expressos, sendo 7 deles induzidos por carência de nitrogênio de modo dependente de σ^N . Embora o gene *glnA* não tenha sido detectado nesta análise, foi verificado que seu promotor é dependente de σ^N . Assim, σ^N regula genes que codificam estruturas fimbriais e genes da resposta a carência de nitrogênio.

Palavras-chave: Microbiologia. Biologia Molecular. Regulação gênica. Resposta a estresse em bactérias. Fatores sigma. *Xylella fastidiosa*.

ABSTRACT

DA SILVA NETO, J. F. **Role of the alternative sigma factors** σ^{E} **and** σ^{N} **in** *Xylella fastidiosa.* 2007. 166 f. Thesis (Doctoral) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Sigma factors are dissociable subunits of the eubacterial RNA polymerase. In this work it was studied the role of the sigma factors σ^{E} (RpoE) and σ^{N} (RpoN) in the phytopathogenic bacterium Xylella fastidiosa. Using a mutagenesis strategy based in homologous recombination mutant strains were obtained that did not express σ^{E} and σ^{N} , as verified by immunoblotting. The *rpoE* strain is sensitive to ethanol and heat shock, and this phenotype was complemented in *trans*. Global gene expression profiles were obtained by microarray analyses, showing 21 genes under-expressed in rpoN mutant under heat shock. These genes encode periplasmic proteases and chaperones, signal transduction systems and hypothetical proteins. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and primer extension assays allowed to validate the expression profile and to determine the transcriptional start sites of selected genes, confirming their σ^{E} dependent induction by heat shock. Alignment of the mapped promoters revealed a consensus sequence similar to the sequence recognized by extracytoplasmic sigma factors (ECFs) of other bacteria. Protein and mRNA levels of the σ^{E} factor did not change in response to several stresses. Although cotranscription among the genes *rpoE*, its probable anti-sigma factor and a periplasmic protease was observed, the sigma factor did not show auto-regulation, but it regulated positively the gene encoding the anti-sigma in response to heat shock. Microarray analyses comparing J1a12 and *rpoN* strains in rich media indicated few differentially expressed genes. In particular, the *pilA* gene (XF2542), encoding the structural subunit of type IV fimbriae, showed an severely reduced expression, while the operon encoding proteins of the type I fimbriae had its expression increased in rpoN mutant compared to J1a12 strain, as confirmed by gRT-PCR. The transcription start site of the XF2542 gene was determined and confirmed the predicted σ^{N} promoter. Transmission electron microscopy and twitching motility assays revealed that assembly of type IV fimbriae in rpoN mutant still occur, probably because of XF2542 paralogs. However, the *rpoN* mutant presented more biofilm than wild type strain and also an auto-aggregative phenotype. Microarray analyses of transcriptome changes in J1a12 strain under nitrogen starvation during 2, 8 and 12 hours, revealed that 448 genes had altered expression during time course. Comparing the expression profile between J1a12 and *rpoN* strains under nitrogen starvation for two hours, revealed 22 differentially expressed genes, and 7 genes were induced by nitrogen starvation in a σ^{N} -dependent manner. Although the *glnA* gene was not detected in this analysis, it was verified that its promoter is σ^{N} -dependent. Thus, σ^{N} regulates genes that encode fimbrial structures and genes for the nitrogen starvation response.

Keywords: Microbiology. Molecular Biology. Gene regulation. Bacterial stress response. Sigma factors. *Xylella fastidiosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A RNA polimerase e sua interação com o promotor	22
Figura 2: Modelo para regulação da atividade de σ^{E} em resposta a porinas de	
membrana externa desdobradas em <i>E. coli</i>	30
Figura 3: Iniciação da transcrição em promotores dependentes de σ^{54}	37
Figura 4: Aspectos importantes da biologia do fitopatógeno Xylella fastidiosa	40
Figura 5: Construção de vetores de expressão para Xylella fastidiosa	70
Figura 6: Indução e purificação das proteínas de fusão His-RpoN e His-RpoE de	
<i>X. fastidiosa</i> no sistema de expressão de <i>E. coli</i> pProEXHT	73
Figura 7: Metodologia utilizada para geração de mutantes para os fatores sigma	
de Xylella fastidiosa	76
Figura 8: Detecção da integração das construções pUCBM21oriCrpoN650,	
pUCBM21oriCrpoH490 e pUCBM21oriCrpoE450 nos fatores sigma alternativos	
de <i>X. fastidiosa</i> por PCR	78
Figura 9: Confirmação de linhagem mutante rpoN	80
Figura 10: Obtenção e complementação de linhagem mutante rpoE	81
Figura 11: Análise do mutante rpoE em resposta a etanol e choque térmico	83
Figura 12: Validação da expressão de genes do regulon σ^{E} em resposta a	
choque térmico	88
Figura 13: Definição do sítio de ligação para σ ^E	90
Figura 14: Determinação da unidade de transcrição rpoE/XF2240/XF2241	92
Figura 15: Regulação transcricional dos genes rpoE (XF2239) e rseA (XF2240)	
em resposta a estresse por etanol	94
Figura 16: Regulação do fator σ ^E em resposta a estresses	95
Figura 17: Análise dos ativadores dependentes de o ^N no genoma de <i>Xylella</i>	
fastidiosa	100
Figura 18: Regulação negativa dos genes envolvidos na biogênese da fímbria	
do tipo I pelo fator σ ^N em <i>X. fastidiosa</i>	104
Figura 19: Análise dos parálogos de PilA	105
Figura 20: Comparação de seqüência da região promotora de XF2542 entre as	
linhagens J1a12 e 9a5c de <i>X. fastidiosa</i>	107
Figura 21: Análise da região promotora do gene pilA (XF2542)	108

Figura 22: Expressão, purificação e ensaios de ligação do ativador de σ^N PilR a	
região promotora do gene <i>pilA</i>	109
Figura 23: Fímbrias das linhagens J1a12 e rpoN de X. fastidiosa	111
Figura 24: Formação de biofilme e agregação célula a célula da linhagem	
selvagem J1a12 e do mutante <i>rpoN</i>	112
Figura 25: Ensaios de twitching motility	113
Figura 26: Número de genes diferencialmente expressos em X. fastidiosa J1a12	
após 2, 8 e 12 horas de carência de nitrogênio	115
Figura 27: Genes diferencialmente expressos em resposta a carência de	
nitrogênio, agrupados por categorias funcionais, de acordo com o banco de	
dados do genoma de <i>X. fastidiosa</i>	117
Figura 28: Mapeamento do início de transcrição do gene glnA (XF1842) de X.	
fastidiosa	120
Figura 29: Um possível modelo de regulação para o fator sigma ECF σ^{E} de	
Xylella fastidiosa	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados	46
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados em procedimentos de clonagem	49
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR	
quantitativo	62
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de extensão de	
oligonucleotídeo	64
Tabela 5: Matriz de peso baseada em 186 promotores dependentes de σ^{54}	
caracterizados em diferentes bactérias	66
Tabela 6: As quatro ORFs anotadas como fatores sigma bacterianos no	
genoma da linhagem 9a5c de <i>Xylella fastidiosa</i>	67
Tabela 7: Genes positivamente regulados pelo fator o ^E de <i>Xylella fastidiosa</i>	84
Tabela 8: Genes candidatos ao regulon σ ^E de <i>Xylella fastidiosa</i>	86
Tabela 9: Genes associados aos promotores preditos para σ^N com melhor <i>score</i>	
no genoma completo da linhagem 9a5c de <i>Xylella fastidiosa</i>	98
Tabela 10: Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante rpoN	
comparada a linhagem selvagem J1a12	101
Tabela 11: Número de genes diferencialmente expressos na linhagem J1a12 de	
X. fastidiosa submetida a duas, oito e doze horas de carência de nitrogênio	114
Tabela 12: Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante rpoN	
comparada à linhagem J1a12 em condição de carência de nitrogênio	118
Tabela S1: Genes induzidos em carência de nitrogênio na linhagem J1a12 de X.	
fastidiosa	157
Tabela S2: Genes reprimidos em carência de nitrogênio na linhagem J1a12 de	
X. fastidiosa	162

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A RESPOSTA A ESTRESSES E OS FATORES SIGMA	20
1.1.1 A resposta ao choque térmico e o papel do fator σ^{32}	24
1.1.2 A resposta a estresses do envelope e o papel dos fatores sigma de função	
extracitoplasmática	27
1.1.3 A resposta à carência de nitrogênio e o papel do fator σ^{54}	33
1.2 O FITOPATÓGENO Xylella fastidiosa	38
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 LINHAGENS E PLASMÍDEOS	46
3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	47
3.2.1 Meios e condições para cultivo de <i>Escherichia coli</i>	47
3.2.2 Meios e condições para cultivo de Xylella fastidiosa	47
3.3 TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS GERAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR	48
3.3.1 Reações de PCR	48
3.3.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição	50
3.3.3 Eletroforese e purificação de fragmentos de DNA	50
3.3.4 Ligação de DNA	51
3.3.5 Transformação de células competentes por eletroporação	51
3.3.6 Extração de plasmídeo e extração de DNA genômico	52
3.3.7 Seqüenciamento automático de DNA	52
3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E OBTENÇÃO DE	
ANTICORPOS POLICLONAIS	53
3.5 CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO	54
3.6 CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES	55
3.7 ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS LINHAGENS MUTANTES	57
3.7.1 Testes de sobrevivência	57
3.7.2 Ensaio de formação de biofilme	57
3.7.3 Ensaio de twitching motility	57
3.7.4 Ensaio de auto-agregação	58
3.7.5 Microscopia eletrônica de transmissão	58

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	58
3.9 MICROARRANJOS DE DNA	59
3.9.1 Preparação das sondas de cDNA marcadas com os fluoróforos	60
3.9.2 Hibridização e lavagens	60
3.9.3 Aquisição das imagens e análise e normalização dos dados	61
3.10 RT-PCR QUANTITATIVO (qRT-PCR)	61
3.11 ANÁLISE DA UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO XF2239-XF2240-XF2241	63
3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA σ ^E EM RESPOSTA A	
ESTRESSES	63
3.13 MAPEAMENTO DOS SÍTIOS DE INÍCIO DE TRANSCRIÇÃO	63
3.14 ENSAIO DE ALTERAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA).	65
3.15 BUSCA IN SILICO DE ELEMENTOS CONSERVADOS DOS	
PROMOTORES	65
4 RESULTADOS	67
4.1 OBTENÇÃO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS PARA O ESTUDO DOS	
FATORES SIGMA ALTERNATIVOS DE Xylella fastidiosa	69
4.1.1 Construção de vetores de expressão para Xylella fastidiosa	69
4.1.2 Purificação das proteínas e produção de anticorpos para os fatores sigma	
alternativos de Xylella fastidiosa	72
4.1.3 Construção de linhagens mutantes para os fatores sigma alternativos de	
Xylella fastidiosa	75
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MUTANTE <i>rpoE</i> E DEFINIÇÃO DO	
REGULON σ ^E DE <i>Xylella fastidiosa</i>	82
4.2.1 Papel do fator σ ^E de <i>Xylella fastidiosa</i> na resposta a estresses	82
4.2.2 Identificação de membros do regulon σ^{E} de <i>Xylella fastidiosa</i>	84
4.2.3 Regulação do fator σ ^E de <i>Xylella fastidiosa</i>	91
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MUTANTE <i>rpoN</i> E DEFINIÇÃO DO	
REGULON σ ^N DE <i>Xylella fastidiosa</i>	96
4.3.1 Análise <i>in silico</i> de regulon σ ^N de <i>Xylella fastidiosa</i>	96
4.3.2 Papel de σ^N na regulação de genes que codificam estruturas fimbriais	101
4.3.3 Resposta transcricional à carência de nitrogênio e o papel de σ^N	113
5 DISCUSSÃO	121
5.1 PAPEL DO FATOR σ ^E DE <i>Xylella fastidiosa</i>	125

5.2 PAPEL DO FATOR σ ^N DE <i>Xylella fastidiosa</i>	131
6 CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS	139
ANEXOS	156
ANEXO 1 - Genes induzidos em carência de nitrogênio	157
ANEXO 2 - Genes reprimidos em carência de nitrogênio	162
ANEXO 3 - Artigos publicados deste trabalho	166

1 INTRODUÇÃO

1.1 A RESPOSTA A ESTRESSES E OS FATORES SIGMA

A célula bacteriana, em contato direto com o meio externo, necessita responder rapidamente a variações em diversos fatores ambientais, como mudanças de temperatura, disponibilidade de nutrientes e presença de moléculas tóxicas, elaborando uma resposta adequada que leve em consideração o princípio da economia celular e a necessidade de proteção às condições adversas. Um limitado número de classes de sinais diferentes é detectado por bactérias, incluindo nutrientes pequenas moléculas (espécies químicas, como е moléculas sinalizadoras), solventes, superfícies moleculares e estados físico-químicos (temperatura, osmolaridade, conteúdo de água, pressão de oxigênio, potencial redox, etc) (Cases e De Lorenzo, 2005). Embora pouco se saiba a respeito da percepção destes sinais, os mecanismos de transdução e elaboração de uma resposta adequada são bastante conhecidos e, geralmente envolvem a participação de reguladores globais e fatores sigma alternativos, que coordenam a regulação transcricional de vários genes, cujos produtos são necessários para a célula restabelecer as condições anteriores à presença do estresse (Cases e De Lorenzo, 2005). Estresses ambientais para os quais os mecanismos fisiológicos e moleculares de resposta são bem conhecidos incluem estresse térmico (choque de calor e choque frio), estresse osmótico, estresse oxidativo, estresse ácido e adaptação à carência nutricional (Ramos et al., 2001).

As proteínas regulatórias desempenham um papel fundamental neste controle, pois ao ligar-se de modo específico às regiões promotoras, permitem a transcrição coordenada dos genes. A organização dos genes em operons permite coordenar a expressão de genes de função semelhante, enquanto o controle de diferentes genes e operons por um regulador comum – o regulon – permite coordenar a expressão de genes que não precisam estar ligados fisicamente no cromossomo. O avanço metodológico em técnicas de análise em larga escala, como microarranjos de DNA, associado a metodologias genéticas e bioquímicas tradicionais, tem revolucionado o estudo da regulação da expressão gênica, permitindo verificar alterações no perfil transcricional global da célula em resposta aos mais variados estímulos (identificação de estimulons) e a contribuição de reguladores específicos na elaboração destas respostas (identificação de regulons). Este tipo de abordagem tem sido utilizado para estudar a resposta a uma grande variedade de condições em diversas bactérias, incluindo limitação nutricional, transição de fases de crescimento, esporulação, choque térmico, exposição a agentes oxidantes, dentre muitas outras (Rhodius e LaRossa, 2003). A enorme massa de dados gerada por este tipo de análise tem sido empregada na construção de redes regulatórias transcricionais, numa tentativa de entender como estas diferentes respostas, controladas de forma hierárquica por reguladores transcricionais globais e locais, podem ser integradas de modo a revelar a complexidade da resposta bacteriana frente às mudanças fisiológicas e ambientais (Martínez-Antonio e Collado-Vides, 2003).

O processo de decodificação da informação armazenada na seqüência de DNA até a geração de um produto funcional na célula, geralmente uma proteína, oferece múltiplos pontos para controle regulatório. A iniciação da transcrição é o primeiro e mais importante passo na regulação da expressão gênica em bactérias. O nível de transcrição pode ser regulado por fatores transcricionais (ativadores ou repressores), pela seqüência do promotor, por pequenos ligantes e pela estrutura do cromossomo, os quais modulam a freqüência com que um promotor será transcrito pela RNA polimerase. Ainda, diferentes fatores sigma podem competir pelo cerne da RNA polimerase, direcionando-a para transcrição de conjuntos de genes específicos (Browning e Busby, 2004). Níveis pós-transcricionais de controle envolvem estabilidade do mRNA, atenuação da transcrição, taxa de iniciação da tradução, modulação por pequenos RNAs regulatórios, estabilidade da proteína e regulação de sua atividade por modificações pós-traducionais.

Em eubactérias, a RNA polimerase dependente de DNA (RNAP) é uma enzima com múltiplas subunidades responsável pela transcrição de todas as moléculas de RNA da célula (Borukhov e Nudlery, 2003). O cerne da enzima (subunidades $\alpha_2\beta\beta'\omega$) contém toda maquinaria catalítica necessária para síntese de RNA, mas para iniciar a transcrição necessita associar-se à subunidade σ , formando a holoenzima ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$) (Figura 1). A subunidade dissociável σ participa de todos os eventos da iniciação da transcrição, incluindo o reconhecimento de seqüências específicas do promotor, o posicionamento da holoenzima e a abertura da dupla fita de DNA. Um promotor típico apresenta dois hexâmeros conservados, os elementos de seqüência -10 e -35 do promotor, que são os principais determinantes reconhecidos por regiões altamente conservadas dos fatores sigma (Browning e

Busby, 2004) (Figura 1). Neste processo, conhecido como ciclo do sigma, o fator sigma associa-se ao cerne da RNA polimerase para iniciação da transcrição e dissocia-se após a transição para o complexo de elongação. Após o término da transcrição, o cerne da RNAP está livre para associar-se ao sigma e iniciar novo ciclo de transcrição (Mooney *et al.*, 2005).



Figura 1: A RNA polimerase e sua interação com o promotor. O modelo, baseado em estudos cristalográficos, indica as interações entre as diferentes subunidades da holoenzima e os elementos do promotor. As fitas do DNA são mostradas em verde, com os elementos - 10 e -35 destacados em amarelo e seqüências menos comuns em promotores (a região -10 estendida e os elementos UP) destacadas em vermelho. A subunidade sigma é indicada em vermelho com os domínios de interação aos elementos do promotor destacados (σ_2 , σ_3 e σ_4). As subunidades α , β e β ' são indicadas em cinza, azul e rosa, respectivamente. Os domínios globulares da subunidade α que interagem com o DNA são destacados. O sítio ativo da enzima é indicado pelo íon Mg²⁺ (magenta). Modificado de Browning e Busby, 2004.

O primeiro fator sigma foi descoberto em 1969, como a subunidade da RNA polimerase de *Escherichia coli* necessária para reconhecimento do promotor (Burgess *et al.*, 1969). Na década de 80 verificou-se que uma mesma bactéria poderia ter múltiplos fatores sigma, com a descoberta de que o processo de esporulação em *Bacillus subtilis* era controlado por uma cascata de fatores sigma alternativos (Losick e Pero, 1981). Logo em seguida, foi demonstrado, em *E. coli*, que a resposta a determinados estresses era mediada por fatores sigma alternativos e, mais recentemente, com o seqüenciamento completo de genomas, verificou-se a

presença de múltiplos fatores sigma em várias bactérias. A quantidade destes fatores varia de um único gene em *Mycoplasma genitalium* a 63 genes em *Streptomyces coelicolor*, e parece haver correlação entre o número de genes que codificam para fatores sigma e a diversidade de ambientes nos quais a bactéria vive (Mittenhuber, 2002; Gruber e Gross, 2003).

As bactérias utilizam um fator sigma primário, similar ao σ^{70} de *E. coli*, para iniciar a transcrição da maioria dos genes durante a fase de crescimento exponencial e fatores sigma alternativos para a transcrição de classes de promotores específicos, que são ativados durante condições de estresse, transição de fases de crescimento ou diferenciação morfológica. Em bactérias patogênicas, fatores sigma alternativos podem ainda afetar direta ou indiretamente a virulência (Kazmierczak *et al.*, 2005). Com base em similaridade de seqüência, organização estrutural e mecanismos de ação, os fatores sigma bacterianos são agrupados em duas famílias principais, a família σ^{70} e a família σ^{54} (Helmann e Chamberlin, 1988; Wosten, 1998).

A grande maioria dos fatores sigma de eubactérias pertencem à família σ^{70} , que é dividida em vários grupos e subgrupos relacionados filogeneticamente (Lonetto et al., 1992; Helmann, 2002). O grupo 1 corresponde aos fatores sigma primários, incluindo σ^{70} de *E. coli* e seus ortólogos. São proteínas essenciais, responsáveis pela iniciação da transcrição da maioria dos genes da célula. Compartilham quatro regiões de seqüência conservadas, das quais as regiões 2 e 4 são responsáveis pelo reconhecimento de dois hexâmeros conservados, os elementos de seqüência -10 e -35 do promotor, respectivamente. O grupo 2 inclui fatores sigma que embora apresentem alta similaridade com os fatores sigma primários, não são essenciais para o crescimento. O membro mais estudado deste grupo é o fator sigma de fase estacionária (σ^{38} codificado pelo gene *rpoS*). O grupo 3 engloba fatores sigma mais divergentes em relação aos fatores sigma do grupo 1 e geralmente são proteínas menores, pois não apresentam a região 1. Podem ser agrupados em vários grupos filogenéticos, que geralmente apresentam funções similares, como resposta ao choque térmico, biossíntese do flagelo e esporulação. O grupo 4, também chamado de subfamília de fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF) (Lonetto et al., 1994), engloba um grande número de pequenos fatores sigma (apresentam apenas as regiões 2 e 4) cujos membros estão envolvidos em respostas associadas ao envelope celular. Finalmente, o grupo 5

inclui os fatores sigma da família σ^{70} mais divergentes em seqüência, estrutura e função, descritos recentemente (Dupuy e Matamouros, 2006). Neste grupo estão TcdR, BotR, TetR e UviA, fatores sigma que dirigem a transcrição dos genes da toxina A e toxina B em *Clostridium difficile*, os genes da neurotoxina em *C. botulinum* e *C. tetani*, e o gene da bacteriocina em *C. perfringens* (Dupuy e Matamouros, 2006; Helmann, 2002).

Como a maioria das bactérias tem vários fatores sigma e todos eles atuam em conjunção com o mesmo cerne da RNAP, é necessária a existência de mecanismos que garantam a apropriada organização do espaço transcricional entre estes múltiplos fatores (Gruber e Gross, 2003). E. coli, por exemplo, possui sete subunidades sigma, σ^{70} (RpoD), σ^{54} (RpoN), σ^{38} (RpoS), σ^{32} (RpoH), σ^{24} (RpoE), σ^{28} (FliA) e Fecl, que competem por uma limitada quantidade de RNAP para transcrever conjuntos específicos de genes (Ishihama, 2000; Grigorova et al., 2006). O modelo de competição inicialmente assumia que a ligação de diferentes fatores sigma ao cerne da RNAP dependia apenas da concentração e da afinidade relativa de cada sigma. No entanto, estudos recentes indicam que a pequena molécula ppGpp (tetrafosfato de guanosina) atua como um importante regulador da ligação diferencial de fatores sigma ao cerne da RNAP, favorecendo a ligação de fatores sigma alternativos em detrimento do fator sigma primário (Jishage et al., 2002; Laurie et al., 2003; Magnusson et al., 2005). Inúmeras estratégias regulatórias também são empregadas para alterar a quantidade e a atividade de fatores sigma na célula. O fato de vários fatores sigma apresentarem regulação em todos os níveis possíveis, estando entre os genes que possuem maior complexidade regulatória na célula (Yura, 1996; Hengge-Aronis, 2002) indica a importância de manter um refinado controle destas proteínas para evitar perturbações no processo de transcrição. Em muitos casos esta regulação envolve fatores anti-sigma que modulam a atividade do fator sigma cognato independente de sua transcrição e tradução, sendo também os próprios anti-sigma sujeitos a variados mecanismos regulatórios, muitas vezes em resposta a sinais ambientais (Hughes e Mathee, 1998; Helmann, 1999).

1.1.1 A resposta ao choque térmico e o papel do fator σ^{32}

A resposta ao choque térmico é universal entre os organismos e corresponde a um rápido e transitório aumento na síntese de um conjunto específico de proteínas, as proteínas de choque térmico, sobretudo *chaperones* e proteases, necessárias para proteger a célula do principal efeito da elevação da temperatura, a geração e o acúmulo de proteínas desdobradas (Rosen e Ron, 2002). Embora muitas proteínas de choque térmico sejam altamente conservadas, os mecanismos de controle de sua expressão variam entre os organismos.

Em eubactérias, a expressão dos genes de choque térmico é controlada em nível transcricional por mecanismos positivos e negativos. Controle positivo corresponde ao uso de fatores sigma alternativos que direcionam a RNA polimerase aos promotores dos genes de choque térmico, destacando-se os fatores $\sigma^{32} e \sigma^E$ de bactérias Gram-negativas, e o fator geral de estresse σ^B de bactérias Gram-positivas (Narberhaus, 1999). O controle negativo, encontrado em cianobactérias, bactérias Gram-positivas e proteobactérias do subgrupo alfa, corresponde ao uso de repressores que se ligam a elementos *cis* do promotor dos genes de choque térmico, limitando sua transcrição em condições fisiológicas, sendo o sistema CIRCE/HrcA um dos mais estudados. Assim, a resposta ao choque térmico é regulada por vários elementos de controle, sendo o estimulon de choque térmico subdividido em vários regulons (Narberhaus, 1999).

Em *E. coli* a resposta ao choque térmico é positivamente controlada pelo uso de fatores sigma alternativos. Embora os fatores $\sigma^{E} e \sigma^{54}$ exerçam certo papel, controlando a resposta ao choque térmico extremo e a resposta ao choque por fago, respectivamente (Narberhaus, 1999), a clássica resposta ao aumento da temperatura de 30 °C para 42 °C é mediada pelo fator sigma de choque térmico σ^{32} (Grossman *et al.*, 1984), codificado pelo gene *rpoH* (Landick *et al.*, 1984). Quando as células de *E. coli* são expostas a um aumento de temperatura de 30 °C para 42 °C a RNA polimerase associada ao σ^{32} reconhece os promotores dos genes de choque térmico, transcrevendo-os. Estes genes codificam para *chaperones* moleculares, que auxiliam o dobramento de outras proteínas, como GroEL/GroES e DnaK/DnaJ e proteases, como Lon, ClpP/HsIU e FtsH. Os primeiros trabalhos estudando o regulon σ^{32} de *E. coli* identificaram aproximadamente 30 genes induzidos por choque térmico, muitos deles de modo dependente de σ^{32} (Lemaux *et al.*, 1978; Chuang *et al.*, 1993).

Recentemente, o regulon σ^{32} de *E. coli* tem sido estudado de forma mais global, utilizando técnicas mais abrangentes. A primeira análise sistemática deste

regulon identificou pelo menos 32 promotores dependentes de σ^{32} , estudando a mudança transcricional global em resposta a níveis artificialmente aumentados de σ^{32} , através de microarranjos de DNA (Zhao *et al.*, 2005). Uma abordagem de transcriptoma semelhante, associada à análise de bioinformática, identificou 49 promotores dependentes de σ^{32} , confirmando os genes já previamente identificados e revelando novos aspectos da resposta celular ao choque térmico (Nonaka et al., 2006). Finalmente, em um trabalho utilizando a técnica de imunoprecipitação da cromatina acoplada com microarranjo de DNA (ChIP-chip) foram identificados 87 alvos *in vivo* de σ^{32} , sendo 52 promotores já descritos. Além do número inesperadamente elevado de promotores dependentes de σ^{32} , outras surpresas reveladas foram a presença de muitos destes promotores dentro de regiões codificadoras e a extensiva sobreposição de promotores dependentes de σ^{32} e σ^{E} com σ^{70} , com a RNAP σ^{32} e a RNAP σ^{70} iniciando a transcrição com a mesma eficiência a partir de posições idênticas (Wade et al., 2006). Análise das mudanças globais no transcriptoma em resposta a choque térmico, utilizando microarranjos de DNA, tem sido feita para muitas outras bactérias, como Shewanella oneidensis (Gao et al., 2004), Yersinia pestis (Han et al., 2004) e Xylella fastidiosa (Koide et al., 2006).

A rápida e transitória transcrição dos genes de choque térmico é controlada pela regulação da síntese, atividade e estabilidade de σ^{32} utilizando mecanismos de retroalimentação que incorporam informações da temperatura e do estado de dobramento de proteínas da célula (Arsene *et al.*, 2000; El-Samad *et al.*, 2005). O primeiro nível de regulação do fator sigma σ^{32} é a transcrição. Embora não apresente papel importante na resposta ao choque térmico (30 °C para 42 °C), o controle transcricional do gene *rpoH* é bastante complexo. A região regulatória de *rpoH* contém cinco promotores (P1, P3, P4, P5 e P6) e é modulada por vários fatores, incluindo três fatores sigma, o regulador global CRP, a proteína DnaA e o antiativador CytR (Yura, 1996; Arsene *et al.*, 2000). Os promotores P1, P4 e P5 são reconhecidos pela RNA polimerase contendo σ^{70} (Erickson *et al.*, 1987), enquanto P3 e P6 são reconhecidos pela RNA polimerase contendo σ^E e σ^{54} , respectivamente (Wang e Kaguni, 1989; Janaszak *et al.*, 2007). Os promotores P1 e P4 são responsáveis pela maior parte da transcrição a 30 °C, enquanto P3 é o único

promotor ativo a 50 °C, interconectando o regulon σ^{32} ao regulon de choque térmico extremo σ^{E} .

A síntese de σ^{32} é regulada primariamente em nível de tradução e é mediada pela estrutura secundária do mRNA de *rpoH*, sobretudo as regiões A e B localizadas na região 5' do RNA mensageiro (Yura, 1996). A 30 °C a tradução é reprimida pela formação de estruturas secundárias que bloqueiam a seqüência de Shine-Dalgarno, impedindo a iniciação da tradução. Deste modo o mRNA de *rpoH* funciona como um termosensor que garante aumento nos níveis de σ^{32} antes do aparecimento de proteínas desnaturadas na célula (Morita *et al.*, 1999).

O nível seguinte é a regulação da estabilidade e da atividade de σ^{32} , que envolve um balanço dos níveis de *chaperones* e proteases do próprio regulon σ^{32} e a quantidade de proteínas desnaturadas na célula. Em temperatura normal de crescimento σ^{32} é rapidamente degradado, mas elevação na temperatura causa sua estabilização. A instabilidade da proteína em temperatura normal envolve a maquinaria de *chaperones* DnaK/DnaJ/GrpE que seqüestra σ^{32} , impedindo sua ligação ao cerne da RNA polimerase (controle da atividade) e direcionando-o para degradação pela protease FtsH (controle da estabilidade). O aumento da temperatura causa 0 acúmulo de proteínas desnaturadas que ligam preferencialmente as chaperones DnaK/DnaJ/GrpE, levando a liberação e estabilização de σ^{32} e sua associação com a RNA polimerase para transcrição dos genes de choque térmico. Quando suficientes chaperones livres se acumulam, elas exercem um controle de retroalimentação negativa na estabilidade e atividade de σ^{32} , garantindo um controle homeostático da guantidade de σ^{32} ativo e da expressão dos genes de choque térmico com base na quantidade de proteínas desnaturadas na célula (Yura, 1996; Yura e Nakahigashi, 1999; Arsene et al., 2000).

1.1.2 A resposta a estresses do envelope e o papel dos fatores sigma de função extracitoplasmática

O envelope celular de bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, compreende o periplasma e a membrana externa. Este compartimento celular é dinâmico e complexo e possui propriedades nitidamente diferentes do citoplasma. Enquanto o citoplasma é rico em energia, apresenta condições redutoras e é osmoticamente

estável, o periplasma não possui ATP, apresenta condições oxidantes e está em maior contato com o meio externo (Oliver, 1996). Dentre as várias funções do envelope estão manutenção da forma e rigidez da célula (pela camada de peptidioglicano do periplasma), comunicação com o ambiente externo, captação de nutrientes, exclusão de compostos tóxicos, interação com células hospedeiras, outras bactérias ou bacteriófagos, geração de energia e biossíntese e montagem de macromoléculas. Muitas destas funções são realizadas por proteínas que para funcionarem corretamente precisam transportadas ser е montadas no compartimento celular adeguado. Vários fatores participam do controle de gualidade de proteínas no periplasma, incluindo chaperones moleculares (Skp), proteases (DegP/HtrA) e facilitadores do dobramento de proteínas, como peptidil prolil isomerases (SurA, FkpA, PpiD, and PpiA) e isomerases de pontes disulfeto (DsbA, DsbC) (Miot e Betton, 2004; Mogensen e Otzen, 2005).

Devido à sua localização, o envelope está sujeito a várias perturbações que precisam ser monitoradas para garantir a integridade da célula. Em bactérias Gramnegativas as respostas a estresses são compartimentalizadas e os sistemas de resposta a perturbações que ocorrem fora do citoplasma da célula são coletivamente conhecidos como resposta a estresse do envelope ou resposta a estresse extracitoplasmático. Como os sinais de estresse afetam o envelope e os fatores de transcrição necessários para elaboração das respostas estão localizados no citoplasma, são necessárias vias de transdução de sinal inter-compartimento. Quatro vias de transdução de sinal têm sido identificadas em E. coli que mediam respostas apropriadas, através de alterações na expressão gênica, para garantir a integridade do envelope: o fator sigma alternativo de função extracitoplasmática σ^{E} e o sistema de dois componentes CpxAR, cujas respostas são bem conhecidas, e dois sistemas adicionais menos estudados, o sistema de dois componentes BaeSR e a resposta ao choque por fago (Raivio, 2005; Rowley et al., 2006). Embora apresentem características distintas em seus mecanismos de percepção e transdução, de modo geral estas vias de resposta a estresse são ativadas por proteínas desdobradas, fragmentos de proteínas ou proteínas mal localizadas no envelope.

Uma das primeiras evidências da capacidade de *E. coli* de responder a estresses extracitoplasmáticos foi a descoberta de que a síntese do promotor P3 do gene *rpoH* (Erickson e Gross, 1989; Wang e Kaguni, 1989) e a síntese da protease periplasmática DegP (Lipinska *et al.*, 1988) em altas temperaturas (50 °C) era

realizada por um mecanismo independente da resposta a choque térmico citoplasmática, através do uso do fator σ^{E} , definindo um segundo regulon de choque térmico. Além da indução por estresses que afetam a célula inteira, como choque térmico e etanol, estudos subseqüentes demonstraram que σ^{E} responde especificamente a estresses do envelope, como o acúmulo de porinas desdobradas (Mecsas *et al.*, 1993), produção anormal de lipopolissacarídeos (Missiakas *et al.*, 1996) e mutações que inativam *chaperones* periplasmáticas (Raina *et al.*, 1995).

Em adição a *rpoH* e *degP*, muitos outros genes regulados por σ^{E} têm sido identificados, incluindo genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de lipopolisacarídeos e no dobramento e degradação de polipeptídeos (proteases, *chaperones*, peptidil prolil isomerases (PPIases) e isomerases de pontes disulfeto) (Dartigalongue *et al.*, 2001; Rezuchova *et al.*, 2003). Estudo recente, utilizando análise por microarranjo de DNA, associada à análise de bioinformática, identificou 89 promotores dependentes de σ^{E} em *E. coli* e outras bactérias relacionadas, confirmando os genes já previamente identificados e revelando novos alvos de σ^{E} , muitos deles associados com patogenicidade (Rhodius *et al.*, 2006). O fato de regular tantos genes poderia explicar porque *rpoE* é essencial em *E. coli* para o crescimento em qualquer temperatura (De Las Peñas *et al.*, 1997).

Uma série de estudos recentes tem elucidado detalhadamente a via de transdução de sinal que ativa σ^{E} em resposta a porinas de membrana externa desdobradas em *E. coli* (Figura 2) (Ades, 2004; Alba e Gross, 2004). Quatro proteínas importantes nesta via de transdução são: o fator anti-sigma RseA ancorado na membrana interna, a proteína periplasmática RseB e as proteases DegS e YaeL (RseP). As proteínas RseA e RseB, codificadas no operon *rpoE-rseABC*, são reguladores negativos da atividade de σ^{E} (Missiakas *et al.*, 1997) e na ausência do estresse RseA mantêm σ^{E} seqüestrado na membrana interna. O principal ponto de regulação é o controle da estabilidade de RseA. Durante o choque térmico e na presença de níveis elevados de monômeros de porinas a meia-vida de RseA é reduzida drasticamente, devido à ação seqüencial das proteases DegS e YaeL. O domínio PDZ de DegS interage com porinas desdobradas, liberando a atividade proteolítica de DegS, que cliva o sítio periplasmático de RseA. Então, YaeL (RseP) realiza clivagem intramembrana de RseA, liberando um complexo RseA- σ^{E} no citoplasma, que ao ligar-se em SspB é direcionado para proteólise pela protease

ClpXP (Figura 2). Isto permite a liberação de σ^{E} para associar-se ao cerne da RNA polimerase e transcrever os genes do seu regulon, incluindo seu próprio operon, em um mecanismo de auto-regulação positiva que permite amplificação e subseqüente desligamento da resposta (Ades, 2004; Alba e Gross, 2004; Rowley *et al.*, 2006).



Figura 2: Modelo para regulação da atividade de σ^{E} em resposta a porinas de membrana externa desdobradas em *E. coli*. A degradação do fator anti-sigma (RseA) pela ação seqüencial de duas proteases (DegS e RseP) é o principal mecanismo de ativação de σ^{E} . Na ausência de proteínas desdobradas DegS e RseP são mantidas em estado inativo pela ação de seus respectivos domínios PDZ. Na presença do estresse, o carboxi-terminal de porinas desdobradas liga-se ao domínio PDZ de DegS (a) e DegS cliva o domínio periplasmático de RseA (b). Então, ocorre clivagem intra-membrana de RseA pela protease RseP (c), liberando o complexo RseA- σ^{E} no citoplasma. Este complexo associa-se com SspB (d), sendo direcionado para a protease CpIXP, que degrada o fragmento de RseA (e), liberando σ^{E} (f). Após sua liberação, σ^{E} associa-se ao cerne da RNA polimerase (g) e transcreve os genes de seu regulon. Modificado de Rowley *et al.*, 2006.

Uma segunda via de resposta a estresse do envelope em *E. coli* é o sistema Cpx. Este sistema é ativado por estresses do envelope, como pH alcalino, alteração na composição de lipídeos da membrana citoplasmática, superexpressão da lipoproteína NIpE, adesão a superfícies abióticas e acúmulo de subunidades da fímbria tipo P (Raivio, 2005; Rowley *et al.*, 2006). Estes estresses causam a dissociação da proteína periplasmática CpxP da histidina quinase CpxA, que se autofosforila e transfere o fosfato para o regulador de resposta CpxR. Uma vez fosforilado, CpxR controla a expressão de aproximadamente 100 genes (De Wulf *et al.*, 2002), muitos deles codificando proteínas envolvidas em degradação ou dobramento protéico, como a protease DegP (Danese *et al.*, 1995), a isomerase de pontes disulfeto DsbA (Danese e Silhavy, 1997) e as PPIases PpiA e PpiD (Pogliano *et al.*, 1997), além das proteínas CpxP, CpxA e CpxR que regulam a via Cpx (De Wulf *et al.*, 2002). Em bactérias patogênicas, o sistema Cpx está envolvido na regulação da expressão de vários fatores de virulência associados à superfície celular, como fímbrias e efetores secretados pela via de secreção do tipo IV, e o principal papel deste sistema parece ser a regulação de estruturas macromoleculares da superfície (Rowley *et al.*, 2006).

Uma terceira via de resposta a estresse do envelope consiste do sistema de dois componentes composto pela histidina quinase BaeS e o regulador de resposta BaeR, que respondem a presença de substâncias antimocrobianas (Raffa e Raivio, 2002). Finalmente, um quarto sistema de resposta a estresse do envelope corresponde à resposta ao choque por fago mediada pelas proteínas do operon *pspABCDE*, inicialmente descritas por sua indução em bactérias infectadas por fagos filamentosos (Brissette *et al.*, 1990). Apesar da função deste operon ainda não estar bem definida, ele é induzido por vários estresses ambientais e parece ser importante para manter a força próton motriz na membrana interna (Darwin, 2005).

Embora algumas destas vias descritas para *E. coli* sejam restritas a poucas bactérias, a resposta mediada por fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF) está amplamente distribuída entre as bactérias. Estes fatores sigma foram inicialmente descritos como uma subfamília da família σ^{70} com base em alinhamento de seqüência de oito proteínas: σ^{E} de *Streptomyces coelicolor*, AlgU de *Pseudomonas aeruginosa*, σ^{E} e FecI de *Escherichia coli*, CarQ de *Myxococcus xanthus*, HrpL de *Pseudomonas syringae*, CnrH de *Alcaligenes eutrophus* e SigX de *Bacillus subtilis* (Lonetto *et al.*, 1994). Uma característica unificadora dos diferentes processos fisiológicos exercidos pelas proteínas deste grupo é que todos eles envolviam funções relacionadas ao envelope celular, derivando assim a denominação fatores sigma de função extracitoplasmática (Lonetto *et al.*, 1994). Com o seqüenciamento de grande número de genomas bacterianos descobriu-se

que este é o grupo de fatores sigma com o maior número de representantes, e algumas bactérias possuem vários destes sigma ECFs (7 em *Bacillus subtilis*, 10 em *Mycobacterium tuberculosis*, 13 em *Caulobacter crescentus*, 50 em *Steptomyces coelicolor*), tornando um desafio o estudo de suas funções e a determinação de seus regulons.

Toda esta diversidade tem sido muito estudada recentemente e, salvo exceções, algumas características comuns dos fatores sigma ECFs parecem emergir: eles coordenam a resposta transcricional a estímulos extracelulares, a via de transdução de sinal envolve um fator anti-sigma localizado na membrana, regulam positivamente sua própria síntese e em vários casos apresentam sobreposição de reconhecimento dos promotores e redundância funcional (Helmann, 2002). Os fatores sigma ECFs são ainda divididos entre aqueles que respondem a uma ampla variedade de estresses, que são a maioria, e um pequeno grupo chamado sigma ECFs do tipo Fecl, envolvidos especificamente na resposta a carência a ferro (Braun *et al.*, 2003). Além do σ^{E} de *E. coli*, já descrito, alguns exemplos de fatores sigma ECFs bem caracterizados, são: AlgU de Pseudomonas aeruginosa, envolvido na biossíntese do polissacarídeo alginato e na resposta a choque térmico e estresse oxidativo; σ^{E} de Salmonella enterica, envolvido na resposta a estresse oxidativo, pH ácido, choque térmico e carência de carbono; σ^{X} , σ^{W} e σ^{M} de *Bacillus subtilis*, envolvidos na resposta a múltiplos estresses, como choque térmico, estresse oxidativo, antibióticos que atuam na parede celular, etanol, estresse osmótico e estresse ácido; σ^{C} , σ^{E} e σ^{H} de *Mycobacterium tuberculosis*, envolvidos na resposta a estresse oxidativo, detergentes e choque térmico (Helmann, 2002; Rowley et al., 2006).

Vários sigma ECFs têm papel importante em patogenicidade: AlgU de *Pseudomonas aeruginosa* está envolvido na biossíntese de alginato, um polissacarídeo extracelular responsável pela conversão ao fenótipo mucóide em pacientes com fibrose cística; HrpL de *Pseudomonas syringeae* controla a síntese de efetores secretados pela via de secreção do tipo III; RpoE de *Salmonella typhimurium* regula a protease de periplasma DegP; e σ^{C} , σ^{E} e σ^{H} de *Mycobacterium tuberculosis,* cujos mutantes têm deficiência no estabelecimento e manutenção da infecção em macrófagos de camundongos (Bashyam e Hasnain, 2004; Raivio, 2005; Rowley *et al.*, 2006).

1.1.3 A resposta à carência de nitrogênio e o papel do fator σ^{54}

O nitrogênio é um componente essencial de importantes macromoléculas da célula bacteriana, como proteínas, ácidos nucléicos e elementos da parede celular. As bactérias possuem capacidade de utilizar fontes inorgânicas, como gás dinitrogênio, nitrito, nitrato e amônia, além de fontes orgânicas de nitrogênio, tais como aminoácidos, aminoacúcares, nucleobases e outras unidades monoméricas de macromoléculas nitrogenadas (Reitzer, 1996). No entanto, esta capacidade varia de acordo com o organismo. A fixação de nitrogênio atmosférico (N₂), por exemplo, está restrita a um pequeno grupo de bactérias e mesmo a assimilação de fontes inorgânicas mais reduzidas, como nitrito e nitrato, não é realizada por todas as bactérias. A fonte de nitrogênio inorgânico mais reduzido, a amônia, é a forma incorporada nos esqueletos de carbono dos metabólitos intracelulares, razão pela qual a presença deste composto desempenha papel fundamental no processo de assimilação de nitrogênio (Reitzer, 1996).

A amônia é considerada a fonte de nitrogênio preferida para crescimento de *E. coli* em meio mínimo, pois permite o mais rápido crescimento e evita a síntese de várias enzimas do metabolismo de nitrogênio. Além disso, amônia é o ponto central de assimilação de nitrogênio porque os produtos primários desta assimilação são glutamato e glutamina, os maiores doadores intracelulares de nitrogênio (Reitzer, 2003). Há duas rotas de assimilação de amônia em *E. coli*: na primeira via, a enzima glutamato desidrogenase (GDH), produto do gene *gdh*, assimila amônia e sintetiza glutamato; na segunda via, a enzima glutamato sintase (GOGAT), produto do genes *gltBD*, sintetiza glutamato.

 $\begin{array}{l} \alpha \text{-cetoglutarato} + \text{NH}_3 + \text{NADPH} \twoheadrightarrow \text{glutamato} + \text{NADP}^+ (\text{GDH}) \\ \text{glutamato} + \text{ATP} + \text{NH}_3 \twoheadrightarrow \text{glutamina} + \text{ADP} + \text{PO}_4^{-2} (\text{GS}) \\ \text{glutamina} + \alpha \text{-cetoglutarato} + \text{NADPH} \twoheadrightarrow 2 \text{glutamato} + \text{NADP}^+ (\text{GOGAT}) \end{array}$

A via GS-GOGAT necessita de ATP e é usada em situações de abundância de energia, enquanto a via GDH é empregada em situações de escassez de energia. A via GS-GOGAT é mais apropriada para assimilação de amônia em situação de limitação de nitrogênio, pois GS tem um Km bem menor para amônia do que GDH. O crescimento de *E. coli* em fontes alternativas de nitrogênio é mais lento e é considerada uma situação de limitação de nitrogênio. Crescimento nesta situação afeta a expressão de mais de 100 genes, numa resposta coordenada chamada resposta regulada por nitrogênio (Ntr) (Reitzer, 2003).

Vários reguladores e fatores ambientais controlam a resposta Ntr e o nível intracelular de glutamina parece ser o principal sinal percebido pelas enzimas que compõem esta complexa cascata regulatória. Em *E. coli* e outras enterobactérias, as principais proteínas envolvidas na resposta Ntr são: o fator σ^{54} (produto do gene *rpoN*), o sistema de dois componentes NtrB-NtrC (produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*), as proteínas de transdução de sinal do tipo PII GlnB e GlnK (produtos dos genes *glnB* e *glnK*), as enzimas bifuncionais GlnD (uridililtransferase/uridilil-remoção, UTase/UR) e GlnE (adenililtransferase/adenilil-remoção, ATase/AR) (produtos dos genes *glnD* e *glnE*), a enzima glutamina sintetase (produto do gene *glnA*) e o transportador de amônia AmtB (produto do gene *amtB*) (Arcondeguy *et al.*, 2001; Reitzer e Schneider, 2001).

Variação nos níveis de nitrogênio regula a atividade específica de GS, a síntese de GS, e a expressão dos outros genes Ntr da seguinte forma: altos níveis de glutamina (suficiência de nitrogênio) estimula atividade UR da enzima UTase/UR, a primeira enzima da cascata Ntr, que remove uridina monofosfato (UMP) de GInB-UMP e GInK-UMP. GInB e GInK não modificadas atuam tanto estimulando a atividade da enzima bi-funcional adenililtransferase (ATase) que adenila GS, resultando na diminuição de sua atividade, quanto atuam interagindo com NtrB, estimulando a desfosforilação do regulador de transcrição NtrC. O efeito final é a reduzida atividade de GS e a baixa expressão do operon *glnAntrBC* (que codifica GS, NtrB e NtrC, respectivamente) e incapacidade de ativar os outros genes Ntr. Por outro lado, baixos níveis de glutamina (limitação de nitrogênio) estimula atividade UTAse da enzima UTAse/UR, que uridilila GlnB e GlnK. GlnB-UMP e GlnK-UMP interagem com adenililtransferase, estimulando a remoção dos grupos adenilil de GS, o que restaura sua atividade. Ao mesmo tempo, GInB-UMP e GInK-UMP são incapazes de interagir com NtrB. Nesta situação, NtrB se autofosforila e transfere o fosfato ativado para NtrC. NtrC~P atua ativando vários promotores dependentes de o⁵⁴ regulados por carência de nitrogênio (Ninfa e Atkinson, 2000; Reitzer e Schneider, 2001; Reitzer, 2003).

Em E. coli, a maioria dos genes da resposta Ntr são regulados direta ou indiretamente pelo sistema NtrB/NtrC em conjunção com σ^{54} , e a função primordial destes genes é assimilar nitrogênio quando o nível de glutamina intracelular está reduzido. Através de análises por microarranjo de DNA, associadas à busca in silico por promotores dependentes de σ^{54} , foram identificados 14 promotores diretamente ativados por NtrC durante limitação de nitrogênio. Dentre eles estão glnAntrBC, glnK-amtB, astCADBE (catabolismo de arginina), nac (ativador transcricional dependente de σ^{70}), *glnHPQ* (transporte de glutamina), *argThisJMPQ* (transporte de arginina e histidina), *gltIJKL* (transporte de glutamato-aspartato), b1012-b1006 (possível catabolismo de pirimidina), chaC (transporte de cálcio), ddpXABCDE (metabolismo de D-alanina–D-alanina), potFGHI (transporte de putrescina), yeaGH (função desconhecida), *ygjG* (transaminase) e *yhdWXYZ* (transporte de aminoácido) (Zimmer et al., 2000; Reitzer e Schneider, 2001). Muitos outros genes são ativados por NtrC de modo indireto via regulação do ativador transcricional Nac, que ativa promotores dependentes de σ^{70} (Zimmer *et al.*, 2000). De modo geral estes genes podem ser classificados como reguladores, proteínas transportadoras e enzimas de catabolismo de compostos nitrogenados, compondo uma resposta para superar a escassez de nitrogênio (Reitzer e Schneider, 2001).

A assimilação de amônia requer energia e utiliza intermediários do metabolismo central. Assim, mecanismos regulatórios globais são necessários para integrar o metabolismo de carbono ao metabolismo de nitrogênio, mesmo em situações favoráveis de crescimento. Alguns dos reguladores globais envolvidos nesta coordenação do metabolismo em resposta a vários sinais são a proteína regulatória de resposta à leucina (Lrp), a pequena molécula tetrafosfato de guanosina (ppGpp) e as proteínas da família PII. Estes reguladores integram sinais de carbono, energia e nitrogênio, garantindo a regulação adequada das múltiplas vias do metabolismo de nitrogênio (Reitzer, 2003). Análise das mudanças globais no transcriptoma em resposta à carência de nitrogênio, utilizando microarranjos de DNA, tem sido feita para muitas outras bactérias, como *Corynebacterium glutamicum* (Silberbach *et al.*, 2005), *Synechocystis sp.* (Osanai *et al.*, 2006), *Prochlorococcus* (Tolonen *et al.*, 2006) e *Anabaena* sp. (Ehira *et al.*, 2003; Ehira e Ohmori, 2006).

Inicialmente identificado como um novo fator sigma necessário para assimilação de nitrogênio em bactérias entéricas (Hirschman *et al.*, 1985; Hunt e Magasanik, 1985), o fator σ^{54} ou σ^{N} (codificado pelo gene *rpoN*) revelou-se

amplamente distribuído entre as bactérias dos mais diversos grupos, embora algumas ausências importantes tenham sido reveladas nos genomas seqüenciados de *Mycobacterium tuberculosis*, *Thermotoga maritima*, *Rickettsia prowazekii*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Synechocystis sp.* linhagem PCC6803 e *Deinococcus radiodurans* (Studholme e Buck, 2000). Por apresentar divergência de seqüência e diferença no mecanismo de ação em relação aos demais fatores sigma (família σ^{70}), o fator σ^{54} foi considerado como uma família distinta, a família σ^{54} (Merrick, 1993). As principais características desta família são: a necessidade de proteínas ativadoras para a iniciação da transcrição, o reconhecimento de seqüências promotoras com posições conservadas nos nucleotídeos -24 e -12 a montante do início de transcrição e o controle de funções celulares pouco relacionadas (Merrick, 1993; Buck *et al.*, 2000).

A associação de σ^{54} ao cerne da RNA polimerase produz uma holoenzima com propriedades bastante distintas de holoenzimas contendo fatores sigma da família σ^{70} . A RNAP σ^{54} reconhece e liga-se a promotores do tipo -24/-12, formando um complexo fechado estável, que não é capaz de isomerização espontânea para um complexo aberto (Figura 3). A formação do complexo aberto (abertura da dupla fita de DNA) é estritamente dependente da ligação de proteínas ativadoras que se ligam em seqüências específicas UAS (do inglês upstream activating sequences), relativamente distantes do sítio de início de transcrição (geralmente 100 nucleotídeos ou mais de distância). Para aproximar o ativador ao complexo RNAPo⁵⁴ é necessária a curvatura da região do DNA entre os dois sítios de ligação, o que pode ocorrer por características intrínsecas da següência de DNA ou pela associação de proteínas associadas ao nucleóide, como o fator de integração ao hospedeiro IHF (do inglês integration host factor), resultando na formação de um laço (Figura 3). Ao associar-se a RNAP σ^{54} , o ativador hidrolisa ATP, o que provoca a transição do complexo fechado para o complexo aberto, permitindo a iniciação da transcrição (Buck et al., 2000; Zhang et al., 2002). Algumas características do mecanismo de iniciação da transcrição por σ^{54} , como uso de *enhancers*, hidrólise de nucleotídeo para abertura das fitas de DNA e modificação da estrutura do DNA por curvatura, são mais comumente encontradas em casos de iniciação da transcrição pela RNA polimerase II de eucariotos do que na iniciação da transcrição baseada em σ^{70} de bactérias (Buck *et al.*, 2000).

36


Figura 3: Iniciação da transcrição em promotores dependentes de σ^{54} . A RNA polimerase associada a fatores σ^{54} (RNAP σ^{54}) reconhece elementos de seqüência conservados, posicionados a -12 e -24 pb do sítio de início de transcrição (+1). A iniciação da transcrição depende de hidrólise de ATP, que ocorre após a interação da holoenzima com proteínas ativadoras (EBPs) ligadas em seqüências localizadas distantes do início de transcrição (UAS). Esta interação envolve a formação de uma alça, facilitada por proteínas de ligação ao DNA, como IHF. Proteínas EBPs geralmente ligam-se na forma de oligômeros, enquanto IHF liga-se como dímero. Adaptado de Cases *et al.*, 2003 e Cases e De Lorenzo, 2005.

Embora ocorra regulação temporal no gene *rpoN* de *Caulobacter crescentus* (Brun e Shapiro, 1992) e *Chlamydia trachomatis* (Mathews *et al.*, 1999) a expressão de *rpoN* é constitutiva na maioria das bactérias e os níveis de σ^{54} são praticamente invariáveis (Jishage *et al.*, 1996; Buck *et al.*, 2000). Assim, o mais importante controle da expressão dos genes dependentes de σ^{54} é a modulação da atividade dos ativadores de σ^{54} . Cada ativador é controlado por sua própria via de transdução de sinal, o que permite um mesmo fator σ^{54} mediar regulação transcricional em resposta a uma ampla variedade de necessidades fisiológicas (Shingler, 1996).

Esta família de ativadores, também conhecidos como proteínas ligadoras de *enhancer* (EBP, do inglês <u>enhancer-binding protein</u>), é composta por proteínas que compartilham uma organização estrutural semelhante, contendo geralmente três domínios. A região carboxi-terminal compreende um domínio que contêm o motivo HTH (do inglês <u>helix-turn-helix</u>) de ligação ao DNA, a região central compreende o módulo de interação ao σ^{54} , sendo a região mais conservada da proteína, e a região aminoterminal compreende um domínio sensor que varia entre os diferentes EBPs, e geralmente regula a atividade ATPásica do domínio central (Morett e Segovia, 1993; Studholme e Dixon, 2003). Diferentes domínios sensores ou mesmo uma combinação entre eles definirão o mecanismo de ativação do EBP, que pode ser desencadeado por fosforilação, interação com pequenas moléculas ou interação com proteínas regulatórias (Studholme e Dixon, 2003). Alguns EBPs bem caracterizados incluem a proteína de regulação de nitrogênio C (NtrC), a proteína de fixação de nitrogênio A (NifA), a proteína de transporte de ácidos dicarboxílicos D (DtcD), a proteína de choque de fago F (PspF), a proteína regulatória de catabolismo de xileno (XyIR) e a proteína de regulação de pilina (PiIR) (Xu e Hoover, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Studholme e Dixon, 2003).

Dentre os processos regulados por σ^{54} em diferentes bactérias, estão a fixação e assimilação de nitrogênio, a utilização de fontes alternativas de carbono, quimiotaxia, formação de flagelo e de pilinas, produção de alginato e patogenicidade (Studholme e Buck, 2000). A maioria das bactérias possui apenas um gene *rpoN*, que geralmente não é essencial. O único caso em que σ^{54} mostrou-se essencial foi na bactéria *Myxococcus xantus* (Keseler e Kaiser, 1997). Alguma poucas bactérias, como *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodobacter sphaeroides* e *Rhizobium etli*, possuem mais de uma cópia do gene *rpoN*. O envolvimento de σ^{54} com patogenicidade tem sido observado em *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* e *Borrelia burgdorferi* (Kazmierczak *et al.*, 2005).

Alguns estudos para definição do regulon σ^{54} de forma global têm sido feitos, por meio de métodos computacionais de busca de consensos, valendo-se da grande conservação das seqüências promotoras deste fator sigma em diversas bactérias. Este tipo de estudo já foi feito para *E. coli* (Reitzer e Schneider, 2001), *Pseudomonas putida* (Cases *et al.*, 2003), *Salmonella typhimurium* (Studholme, 2002) e várias espécies de Rhizobiaceae (Dombrecht *et al.*, 2002). Em *E. coli* o regulon σ^{N} foi estimado conter 30 genes, a maioria deles relacionados a resposta a carência de nitrogênio (Reitzer e Schneider, 2001). Em *Pseudomonas putida* a estimativa é que 55 genes componham o regulon σ^{54} , com funções fisiológicas envolvendo montagem do flagelo e motilidade, metabolismo de nitrogênio e metabolismo de carbono (Cases *et al.*, 2003).

1.2 O FITOPATÓGENO Xylella fastidiosa

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa, não flagelada, limitada ao xilema (Figura 4A) e pertencente ao subgrupo gama das proteobactérias, estando mais relacionada ao gênero *Xanthomonas* (Wells *et al.,* 1987). Esta bactéria possui uma ampla variedade de hospedeiros, causando doenças em diversas plantas de

importância econômica, principalmente em regiões da América do Norte e da América do Sul. Nos Estados Unidos, sobretudo na Califórnia, ela provoca doenças em videiras (doença de Pierce), amendoeiras, alfafa, oleandro, dentre várias outras (Hopkins e Purcell, 2002). No Brasil, em especial no estado de São Paulo, este fitopatógeno é o agente causador da clorose variegada de citros (CVC), doença responsável por perdas na citricultura (Rossetti *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1993).

Vários estudos demonstraram que as diferentes linhagens de *X. fastidiosa* pertencem à mesma espécie, mas apresentam grande variabilidade genética, o que levou alguns autores a proporem a classificação das linhagens em diferentes patovares ou diferentes subespécies (Hendson *et al.*, 2001; Schaad *et al.*, 2004). Baseado em dados de hibridização DNA-DNA, seqüenciamento de regiões espaçadoras 16S-23S e dados fenotípicos, foi proposta a classificação de *X. fastidiosa* em três subespécies: *X. fastidiosa* subsp. p*iercei* (linhagens de videira, alfafa, amendoeira, etc), *X. fastidiosa* subsp. m*ultiplex* (linhagens de pessegueiro, ameixeira, plátano, etc) e *X. fastidiosa* subsp. p*auca* (apenas linhagens de citros) (Schaad *et al.*, 2004).

As várias doenças causadas por *X. fastidiosa* são transmitidas através de cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) que se alimentam da seiva do xilema e que carregam bactérias viáveis de planta a planta (Figura 4B) (Redak *et al.*, 2004). Uma vez dentro dos vasos do xilema, *X. fastidiosa* multiplica-se e causa oclusão vascular, provavelmente devido à produção de goma e a presença de agregados de bactérias, bloqueando o fluxo de água e nutrientes (Figura 4A). Os principais sintomas da doença de Pierce, como a necrose foliar marginal, abscisão das folhas, e o declínio do vigor levando à morte da planta, sugerem uma disfunção do sistema condutor de água (Figura 4C) (Purcell e Hopkins, 1996). Na clorose variegada dos citros, os sintomas incluem clorose intervenal similar àquela vista em deficiências de zinco, tamanho reduzido de frutos e folhas, e lesões na face inferior das folhas, também sugerindo uma disfunção do sistema condutor de água (Figura 4D).

Xylella fastidiosa tem merecido grande atenção em projetos de genômica. Foram seqüenciados os genomas completos da linhagem 9a5c que causa clorose variegada de citros (Xf-CVC) (Simpson *et al.*, 2000) e da linhagem Temecula, causadora da doença de Pierce de videiras (Xf-PD) (Van Sluys *et al.*, 2003) e os genomas parciais das linhagens Dixon (Xf-ALS) de amendoeira e da linhagem Ann1 (Xf-OLS) de *oleandro* (Bhattacharyya *et al.*, 2002b).



Figura 4: Aspectos importantes da biologia do fitopatógeno *Xylella fastidiosa*. (A). A bactéria coloniza apenas o xilema das plantas hospedeiras, provocando o bloqueio dos vasos devido à formação de grumos e a produção de goma. Foto: E. W. Kitajima (ESALQ/USP/Brasil). (B). Várias espécies de cigarrinhas, como *Acrogonia citrina*, são responsáveis pela transmissão da bactéria de uma planta para outra. Foto: Fundação de defesa da citricultura (Fundecitrus). (C). Sintomas da doença de Pierce em videiras *Chardonnay* infectadas com a linhagem Temecula de *X. fastidiosa*. Retirado de Guilhabert e Kirkipatrick, 2005. (D). Sintomas da clorose variegada de citros (CVC) em larajeiras infectadas com *X. fastidiosa*. Fotos: Fundecitrus.

Estudos de genômica comparativa relacionando as seqüências dos genomas acima mencionados têm permitido a identificação de genes específicos de cada linhagem (Van Sluys *et al.,* 2003; Bhattacharyya *et al.,* 2002a). Com o seqüenciamento de genomas de outras bactérias associadas a plantas, este tipo de análise comparativa tem permitido inferências a respeito de vários processos biológicos associados à interação planta-bactéria (Van Sluys *et al.,* 2002; Moreira *et al.,* 2004; Setubal *et al.,* 2005).

O seqüenciamento do genoma da linhagem de citros 9a5c de *Xylella fastidiosa*, o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente seqüenciado, permitiu inferir uma série de possíveis mecanismos relacionados com a patogenicidade, como a produção de polissacarídeos extracelulares, de fímbrias, e

de enzimas que degradam a parede celular (Simpson *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2000; Dow e Daniels, 2000; Keen *et al.*, 2000). No entanto, todos esses possíveis mecanismos de patogenicidade necessitam de uma abordagem experimental para serem confirmados e para que possam ser alterados, representando uma forma de possível controle das doenças causadas por *Xylella fastidiosa*. Os estudos funcionais de genomas bacterianos seqüenciados incluem a obtenção de mutantes e a análise do padrão global de expressão gênica e da produção de proteínas pelo organismo.

Até o seqüenciamento do genoma de *Xylella fastidiosa* em 2000, praticamente não havia estudos genéticos nesta bactéria. Isto se devia, em parte, a características da própria bactéria, como crescimento lento, formação de grumos em meio de cultura, dificuldade de transformação e ausência de ferramentas de manipulação genética e de modelos experimentais. A transformação de *Xylella fastidiosa* foi inicialmente obtida em linhagens de citros, com a utilização de plasmídeos híbridos, contendo a origem de replicação (*oriC*) do cromossomo (Monteiro *et al.*, 2001b) ou plasmídeos endógenos desta bactéria (Qin e Hartung, 2001), ligados a vetores de *E. coli.* Posteriormente, verificou-se que técnicas tradicionais de mutagênese por recombinação homóloga, utilizando vetores suicidas para integração e interrupção de genes alvos de interesse, não funcionavam em linhagens de citros de *Xylella fastidiosa*.

A solução encontrada foi a utilização de vetores replicativos que facilitam a detecção de eventos raros de recombinação, uma estratégia utilizada em bactérias de crescimento lento, como *Mycobacterium bovis* (Baulard *et al.*, 1996) e em bactérias que não possuem o gene *recA*, como *Spiroplasma citri* (Duret *et al.*, 1999). Assim, utilizando vetores contendo origens de replicação de *X. fastidiosa*, seja a origem de replicação (oriC) do cromossomo (Gaurivaud *et al.*, 2002) ou a origem de replicação de um plasmídeo endógeno (Da Silva Neto *et al.*, 2002), foram obtidos os primeiros mutantes por recombinação homóloga nesta bactéria. Já em linhagens que causam doença de Pierce foi descrita a obtenção de mutantes para genes de fímbrias utilizando o sistema de mutagênese por dupla recombinação em vetor suicida (Feil *et al.*, 2003). A mutagênese aleatória por inserção de transposons foi possível somente através da utilização de um sistema melhorado de transposição, o sistema *transposome*, tanto em linhagens que causam a doença de Pierce

(Guilhabert *et al.*, 2001), quanto na linhagem J1a12 que causa clorose variegada de citros (Koide *et al.*, 2004b).

Outro avanço obtido na fase pós-genômica desta bactéria foi o desenvolvimento de modelos experimentais para estudo da patogenicidade em *Nicotiana tabacum* (Lopes *et al.,* 2000) e em *Catharantus roseus* (Monteiro *et al.,* 2001a), embora os sintomas da CVC demorem até 2 meses para se manifestar.

Análises em larga escala do transcriptoma e do proteoma de Xf-CVC têm revelado questões importantes. Microarranjos de DNA contendo as ORFs (do inglês open reading frame, fase aberta de leitura) da linhagem 9a5c de Xf-CVC têm sido usados para estudos de genotipagem: comparação da linhagem 9a5c següenciada com a linhagem J1a12, uma linhagem usada como modelo em estudos de mutagênese e que mostrou não ser patogênica, revelou ausência de genes importantes para virulência na linhagem J1a12 (Koide et al., 2004a); e comparação da linhagem 9a5c com 11 isolados obtidos de diferentes hospedeiros revelou transcrição coordenada de elementos adquiridos por transferência horizontal (Nunes et al., 2003). Microarranjos de DNA foram utilizados também para comparar culturas recém-isoladas da planta a culturas com diversas passagens em laboratório, revelando maior expressão de genes relacionados à adesão e adaptação ao hospedeiro nas culturas bacterianas recém-isoladas da planta (De Souza et al., 2003). Um estudo do proteoma de Xf-CVC identificou as proteínas mais expressas no extrato total e proteínas relacionadas à adesão, diferentes proteases e enzimas antioxidantes na fração extracelular (Smolka et al., 2003).

Embora vários aspectos da biologia e patogenicidade de *X. fastidiosa* sejam ainda incertos, dados recentes têm demonstrado que adesão e motilidade desempenham importante papel no estabelecimento de interações bactéria-bactéria, bactéria-planta e bactéria-vetor, contribuindo para modular virulência nas plantas hospedeiras (Guilhabert e Kirkipatrick, 2005; Meng *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2004). Bactérias usam várias adesinas da superfície celular para aderir e colonizar células hospedeiras, tais como polissacarídeos extracelulares (EPS), fímbrias (pili) e adesinas do tipo hemaglutininas (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006). Um estudo do proteoma de *X. fastidiosa* identificou proteínas de diferentes sistemas de adesão: fímbria tipo IV, fímbria tipo I, adesinas fimbriais do tipo *mrk* e fibrilas do tipo *hsf* (hemaglutininas) (Smolka *et al.*, 2003). Hemaglutinina, uma importante adesina de patógenos animais, media agregação célula-célula *in vitro* e *in planta* e atenua a

patogenicidade de *X. fastidiosa* por limitar sua capacidade de colonização, pois linhagens mutantes em genes de hemaglutininas apresentam fenótipo hipervirulento (Guilhabert e Kirkipatrick, 2005). Fenótipo hipervirulento tem sido observado em alguns outros mutantes de *X. fastidiosa* (Guilhabert e Kirkipatrick, 2005), incluindo mutantes dos genes *rpf*, envolvidos na síntese de um fator difusível de sinalização (DSF), que media sinalização célula-célula (*quorum sensing*) (Newman *et al.*, 2004), indicando que *X. fastidiosa* modula seu parasitismo e patogenicidade.

Recentemente, foi demonstrado que linhagens de videira de X. fastidiosa produzem duas classes de fímbrias polares, fímbria tipo IV longa e fímbria tipo I curta. A fímbria tipo IV está envolvida em twitching motility, um mecanismo de locomoção independente de flagelo usado por X. fastidiosa para migração no sistema vascular da planta hospedeira, enquanto a fímbria tipo I desempenha importante papel em adesão e formação de biofilme (Meng et al., 2005; Li et al., 2007). Muitas bactérias Gram-negativas, incluindo patógenos de plantas e animais, tais como Pseudomonas aeruginosa, Neisseria gonorrhoeae, Dichelobacter nodosus Ralstonia solanacearum, expressam fímbria tipo IV. Dependendo do е organismo este tipo de fímbria pode ser importante para twitching motility, formação de biofilme, transformação natural, agregação e virulência (Craig et al., 2004). A fímbria tipo IV tem sido bem caracterizada em P. aeruginosa, onde aproximadamente 40 genes são necessários para sua biogênese e função, incluindo genes que codificam para a subunidade pilina, proteínas necessárias para montagem e retração, peptidases da pré-pilina e proteínas regulatórias (Mattick, 2002). Embora alguns genes associados à fímbria tipo IV tenham sido identificados em X. fastidiosa (Meng et al., 2005; Li et al., 2007), pouco é conhecido sobre a regulação da biogênese desta fímbria nesta bactéria. Em P. aeruginosa, *Myxococcus xanthus* e *D. nodosus*, o fator σ^{54} e ativadores de σ^{54} são responsáveis pela transcrição de *pilA*, o gene que codifica para subunidade estrutural da fímbria tipo IV (Ishimoto e Lory, 1989; Wu e Kaiser, 1997; Parker et al., 2006).

Atualmente, o uso de ferramentas para análise em larga escala, como microarranjos de DNA, tem impulsionado bastante os estudos de expressão gênica. Monitorando a expressão gênica microbiana de forma global podemos identificar genes não-caracterizados, testar adaptações fisiológicas em diferentes condições ambientais e identificar genes relacionados à virulência do patógeno. O seqüenciamento completo do genoma de *Xylella fastidiosa*, a disponibilidade de

microarranjos de DNA e o aperfeiçoamento de técnicas de mutagênese são ferramentas importantes para caracterizar a função dos genes e para desvendar mecanismos regulatórios nesta bactéria, inclusive àqueles envolvidos na regulação da interação bactéria-hospedeiro. Quatro genes foram anotados como fatores sigma no genoma de *X. fastidosa: rpoD* (σ^{70}), *rpoN* (σ^{N}), *rpoH* (σ^{32}) e *rpoE* (σ^{E}). As ferramentas acima foram utilizadas neste trabalho para definir o papel dos fatores sigma alternativos de *Xylella fastidiosa* na resposta a estresses ambientais.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o papel dos genes regulatórios *rpoE* e *rpoN* de *Xylella fastidiosa*, identificando os genes regulados por estes fatores sigma alternativos e definindo a contribuição de cada regulon para elaboração de respostas a alguns estresses ambientais, como choque térmico e carência de nitrogênio.

As estratégias utilizadas para alcançar o objetivo proposto foram:

✓ Obteção de linhagens mutantes de *Xylella fastidiosa* para os genes *rpoE* (σ^{E}) e *rpoN* (σ^{N}) e avaliação das características fenotípicas destas linhagens;

✓ Determinação dos genes sob regulação de cada fator sigma, através de comparação, em diferentes condições, do perfil transcricional global dos mutantes em relação à linhagem selvagem, por microarranjo de DNA;

✓ Identificação genes diretamente regulados pelos fatores sigma, através de busca por elementos de seqüência conservados no promotor e ensaios de expressão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS E PLASMÍDEOS

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.

Linhagens	Genótipo/Fenótipo	Origem/Referência
<i>E. coli</i> DH5α	SupE44 lacU169 (80 lacZ M15) hsdR 17 recA	Hanahan, 1983
	1 endA 11 gyrA 96 thi-1 relA 1	
X. fastidiosa J1a12	Isolado laranja pêra, transformável, não	Jales, SP, Fundecitrus
	patogênica, forma grumos pequenos	Monteiro <i>et al</i> ., 2001b
X. fastidiosa rpoE	J1a12 (<i>rpoE</i> ::pUCBM21 <i>oriC</i>)	Este trabalho
X. fastidiosa rpoN	J1a12 (<i>rpoN</i> ::pUCBM21 <i>oriC</i>)	Este trabalho
X. fastidiosa rpoE⁺	X. fastidiosa rpoE complementada	Este trabalho
Plasmídeos	Características relevantes ^a	Origem/Referência
pUCBM21	Replicon ColE1, Amp ^r ; Vetor clonagem	Böhringer Mannheim
pBluescriptKS	Replicon ColE1, Amp ^r	Stratagene
pCR 4-TOPO	Vetor para clonagem direta de produto de	Invitrogen
	PCR, Amp ^r ; Can ^r	
pGEM-Teasy	Vetor para clonagem direta de produto de	Promega
	PCR, Amp ^r	
pUC4K	Cassete Can ^r do Tn903 clonado pUC; Amp ^r	GE Healthcare
pProEX HT	Vetor de expressão; promotor induzido por	Invitrogen
	IPTG, repressor <i>lacl</i> ; Amp ^r	
KSp16SpXF1.3	Vetor de expressão constitutiva para X.	Este trabalho
	Fastidiosa	
pUCpXF1.3p <i>bga</i>	Vetor de expressão regulada para X.	Este trabalho
	Fastidiosa	
pUCBM21 <i>oriC</i>	Vetor para mutagênese por recombinação	Este trabalho
	nomologa	
pUCoriC(<i>rpoE</i>)Can	Vetor para complementação mutante rpoE	Este trabalho

^a Abreviaturas: Can, canamicina; Amp, ampicilina; r, resistência.

3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.2.1 Meios e condições para cultivo de *E. coli*

<u>Meio LB</u>: Triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l, pH 7,4. <u>Meio 2 x TY</u>: Triptona 16 g/l; extrato de levedura 10 g/l; NaCl 5 g/l, pH 7,4.

A linhagem DH5 α de *E. coli* (Hanahan, 1983), utilizada em todos os procedimentos de clonagem, foi cultivada a 37 °C em meio LB ou 2 x TY, suplementados com ampicilina (100 µg/ml) ou canamicina (50 µg/ml), quando necessário.

3.2.2 Meios e condições para cultivo de Xylella fastidiosa

<u>Meio PWG</u>: Fitona peptona 4 g/l; tripticase peptona 1g/l; cloreto de hemina 0,001%; K₂HPO₄ 1,2 g/l; KH₂PO₄ 1 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,4 g/l; glutamina 0,4%; glicose 0,5%. <u>Meio XDM₂</u>: K₂HPO₄ 2,1 g/l; KH₂PO₄ 0,8 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,4 g/l; pirofosfato férrico 0,125 g/l; glicose 10 g/l; solução de vitaminas (0,2 mg D-biotina, 10 mg tiamina, 10 mg hidrocloreto de piridoxina, 5 mg ácido nicotínico, 0,05 mg vitamina B12 e 350 mg mio-inositol em 100 ml de água) 10 ml/l; serina 0,4 g/l; metionona 0,4 g/l; asparagina 1 g/l; glutamina 4 g/l.

<u>Meio XDM₀ (meio XDM₂ sem fonte de nitrogênio)</u>: K₂HPO₄ 2,1 g/l; KH₂PO₄ 0,8 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,4 g/l; pirofosfato férrico 0,125 g/l; glicose 10 g/l; solução estoque de vitaminas (0,2 mg D-biotina, 10 mg tiamina, 10 mg hidrocloreto de piridoxina, 5 mg ácido nicotínico, 0,05 mg vitamina B12 e 350 mg mio-inositol em 100 ml de água) 10 ml/l.

O cultivo de *Xylella fastidiosa* J1a12 (Monteiro *et al.*, 2001b) foi realizado em meio de cultura PW (Davis *et al.*, 1981), sem albumina de soro bovino (BSA) e sem vermelho fenol, suplementado com 0,5% de glicose (PWG) ou em meio XDM₂ (Lemos *et al.*, 2003). Para manutenção das culturas foi feito cultivo em placa, em PWG sólido (ágar 1,2%). Em meio líquido o cultivo foi feito em 50 ml de PWG em frascos de 250 ml a temperatura ambiente sem agitação. As linhagens mutantes *rpoN* e *rpoE* foram cultivadas com ampicilina 10 μ g/ml e a linhagem *rpoE*⁺ com

canamicina 5 μ g/ml e ampicilina 10 μ g/ml. As bactérias foram cultivadas até fase logarítmica, por sete dias em meio PWG ou por doze dias em meio XDM₂.

Para estabelecer diferentes situações de estresse o cultivo das linhagens foi realizado em algumas condições específicas. Para estresse térmico, culturas foram diluídas (DO_{600 nm}=0,1), cultivadas por sete dias (até fase logarítmica) em 50 ml de PWG a temperatura ambiente e então submetidas a choque térmico de 40 °C, por 25 minutos, em banho-maria. Para estabelecer condições de carência de nitrogênio as linhagens foram cultivadas em 50 ml de PWG por onze dias e parte destas culturas foi utilizada como pré-inóculo em 100 ml de meio definido XDM₂. Após 12 dias de cultivo em XDM₂, as culturas foram divididas em dois frascos, centrifugadas, lavadas com XDM₂ (tempo 0) ou XDM₀ e cultivadas por 2 horas, 8 horas e 12 horas em carência de nitrogênio (XDM₀).

Para análise da expressão do gene *rpoE* em resposta a diferentes estresses, cultura de J1a12, cultivada em 100 ml de PWG até fase logarítmica, foi dividida em 7 alíquotas. Uma delas permaneceu sem exposição a estresse e as demais foram expostas aos seguintes estresses: sacarose 300 mM, NaCl 250 mM, H₂O₂ 0,1%, choque de calor 45 °C, choque frio 10 °C, todos durante 30 minutos. Uma das alíquotas foi cultivada por 20 dias (fase estacionária). Alíquotas de células submetidas aos diferentes tratamentos foram centrifugadas a 9.000 x g, a 4 °C por 5 minutos e imediatamente congeladas em gelo seco para extração de RNA. Outras condições específicas de cultivo estão indicadas nos respectivos experimentos.

3.3 TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS GERAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.3.1 Reações de PCR

A amplificação por PCR de seqüências do genoma da linhagem J1a12 para clonagem foi feita com enzima de alta fidelidade. As reações de PCR foram feitas utilizando 0,5 µg de DNA genômico da linhagem J1a12, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 0,3 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1 mM, 2,5 U de *Taq Platinum pfx* (Invitrogen) e 1 X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As condições do PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto. Após os 30 ciclos a reação permaneceu a 68 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C. Os produtos de PCR foram purificados

com *Qiaquick PCR purification* (Qiagen) e incubados por 15 minutos a 72 °C com dATP 0,2 mM e 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), em tampão adequado, para adição da adenina às suas extremidades. Os produtos de PCR foram então clonados diretamente no vetor pCR-4TOPO do *TOPO TA Cloning kit* (Invitrogen) ou no vetor pGEM-Teasy do *pGEM Vector System Kit* (Promega) e confirmados por seqüenciamento automático.

Nas reações de PCR de colônia, as células foram ressuspendidas em 20 µl de água milliQ, fervidas por 2 minutos para serem rompidas e 1 µl dessa solução foi utilizado como molde para o PCR. As reações consistiram de 1 µl de DNA das colônias fervidas, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 0,3 mM de cada dNTP, MgCl₂ 2 mM, DMSO 5% (dimetilsufóxido), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1 X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As condições de reação foram: 3 minutos a 95 °C e 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 54 °C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C, seguidos de 7 minutos a 72 °C.

A seqüência completa do genoma da linhagem 9a5c de *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) foi utilizada como referência para desenhar os oligonucleotídeos utilizados na amplificação de seqüências do genoma da linhagem J1a12 de *X. fastidiosa.* Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen ou IDT (*Integrated DNA Technologies*) e aqueles utilizados em reações de PCR para clonagem ou seqüenciamento estão listados na Tabela 2. Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR quantitativo e nos ensaios de extensão de oligonucleotídeo estão indicados nos itens correspondentes.

Nome	Seqüência (5` - 3`)	Finalidade
Bga1 Bga2	gcggccgctgtaggaacagcgatgc gcggatccaaacgcggcgtgatccg	Clonagem do promotor do gene <i>bga</i> para construção de vetor de expressão.
Sigma54-1 Sigma54-2	cgggattcaacgccgatgatgatca cgaattccacctgtttggcgctgag	Clonagem do gene <i>rpoN</i> sem promotor nos vetores de expressão para <i>Xylella.</i>
Sigma32-1 Sigma32-2	cgggatcctgtcactgtgtggttac agaattccctcagccaaatttacgc	Clonagem do gene <i>rpoH</i> sem promotor nos vetores de expressão para <i>Xylella.</i>
Sigma24-1 Sigma24-2	gaggatccgttcggctcactcagga tgaattctttcggacagatggttgc	Clonagem do gene <i>rpoE</i> sem promotor nos vetores de expressão para <i>Xylella.</i>
Ori1 Ori2	gaggatcctgggataaactaatgc tgaattcacaacgtgagctaatgg	Clonagem da origem de replicação do cromossomo de <i>X. fastidiosa.</i>

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados em procedimentos de clonagem.

rpoN1	caggatccgcaacgaaaatgacgac	Clonagem de fragmento interno do gene rpoN para
RpoN3	gaagggcccatgagctgttcgtagcc	mutagenese.
RpoH1	atggattcggtgcattcgcacttgc	Clonagem de fragmento interno do gene rpoH para
RpoH2	taatgggccctcctcactattaccacg	mutagênese.
RpoE1	caggattccgaatacgctgcattcg	Clonagem de fragmento interno do gene rpoE para
RpoE2	tccagggccccaatccatccgttgtgc	mutagênese.
SIG1	acgggatccatgacattgaaagc	Clonagem do gene rpoN no vetor de expressão
SIG2	cggaattcggatcagaggactcgga	pProEX.
SIGMA24C1	aactgcagcgctacacgttacgaatc	Clonagem do gene <i>rpoE</i> com seu promotor, para
SIGIMA2402	cccaagennicggacagaiggngc	complementação.
2542-9a5Fw	tcgcgagcctgaaccaaagc	Clonagem e seqüenciamento da região promotora do
2542-J1812RV	agegalagegaegaggalgge	gene <i>pilA.</i>
PilR1	aggatccatgaatcaatcccgcagtgc	Clonagem do gene <i>pilR</i> no vetor de expressão
PIIR2	gaagetticicattactccatgcccag	pProEX.
Sigma32-P	gcggatccttgggatacttcagtatg	Usado com Sigma32-2 para clonagem do gene rpoH
		no vetor de expressao pProEX.
M13Direto	gtaaaacgacggccagt	PCR de seqüenciamento.
M13Reverso	agcggataacaatttcacacag	PCR de seqüenciamento e PCR para detectar
		integração.
XF2239SP1	ageetetteaattteggeeteattg	Mapeamento do início de transcrição do gene rpoE
XF2239-126R		pelo método 5' RACE.

3.3.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As reações de digestão de DNA de plasmídeo ou de DNA genômico com enzimas de restrição (Invitrogen e Promega) foram realizadas a 30 $^{\circ}$ C ou a 37 $^{\circ}$ C, dependendo da enzima, pelo período de 2 a 5 horas, conforme instruções do fabricante.

3.3.3 Eletroforese e purificação de fragmentos de DNA

Fragmentos de DNA obtidos através de amplificação por PCR ou por digestão de DNA de plasmídeo ou digestão de DNA genômico foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,8% a 2%) em tampão de corrida TBE 1 X (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) a 100 V. As bandas no gel de agarose foram então coradas com brometo de etídeo 0,5 µg/ml, visualizadas sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador e documentadas com câmara fotográfica.

Fragmentos de DNA de interesse foram isolados e purificados por eletroeluição. Após separação por eletroforese, as bandas de interesse foram

recortadas do gel de agarose, colocadas em membrana de diálise com TBE 0,5 X e submetidas à eletroforese a 100 V por 2 horas. Após essa eletroeluição, a solução de TBE 0,5 X contendo o DNA foi tratada com igual volume de fenol/clorofórmio 1:1, precipitada com 1/10 de solução de acetato de sódio (NaOac 3 M pH 5,2) e 2 volumes de etanol 100%, lavada com etanol 70% e ressuspendida em 20 μl de solução TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

3.3.4 Ligação de DNA

Fragmentos de DNA isolados foram ligados nos plasmídeos de interesse utilizando aproximadamente 500 ng de inserto, 20 ng de vetor, 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), em tampão fornecido pelo fabricante, em volume final de 20 µL. As reações de ligação foram incubadas a 19 °C por 16 horas.

3.3.5 Transformação de células competentes por eletroporação

Células competentes de *E. coli* DH5 α foram preparadas conforme descrito (Ausubel *et al.*, 1992). Para transformação, cerca de 1 µl das reações de ligação foi misturado com 40 µl de *E. coli* DH5 α eletrocompetente, a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação gelada e então as células foram eletroporadas nas condições de 1,8 kV, 200 Ω e 25 µF. Imediatamente foi adicionado às células 1 ml do meio LB, transferido para um tubo de vidro estéril e incubado por uma hora com agitação a 37 °C. A seguir, as transformações foram plaqueadas com alça de vidro em meio LB com os antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. Algumas colônias da *E. coli* DH5 α resultantes das transformações foram inoculadas em 2 ml de meio 2 x TY contendo antibióticos adequados e incubadas a 37 °C por 16 horas, com agitação constante de 250 rpm para preparação de DNA de plasmídeo.

Células competentes de *Xylella fastidiosa* foram preparadas conforme descrito (Da Silva Neto *et al.*, 2002). Resumidamente, células cultivadas em meio PWG durante sete dias foram lavadas duas vezes com 30 ml de água milliQ estéril gelada e uma vez com glicerol 10% gelado. Após lavagens, alíquotas concentradas de células ressuspendidas em 40 µl de glicerol 10% foram misturadas com 1 a 5 µg

dos plasmídeos de interesse em cubetas de eletroporação de 0,1 cm. As células foram eletroporadas nas condições de 1,8 kV, 200 Ω e 25 μ F e imediatamente incubadas em 1 ml de meio PWG por 16 horas para recuperação das bactérias. Após esse tempo, 200 μ l das células foram plaqueadas com alça de vidro em placas PWG com antibióticos adequados e cultivadas em temperatura ambiente por até 2 meses até serem descartadas. Os antibióticos utilizados para seleção foram canamicina 5 μ g/ml e ampicilina 10 μ g/ml.

3.3.6 Extração de plasmídeo e extração de DNA genômico

As extrações de plasmídeo foram feitas pelo método de lise alcalina (Ausubel *et al.*, 1992) ou utilizando os sistemas de minipreparação de plasmídeo *QlAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN) e Wizard Plus SV Miniprep (Promega). O DNA genômico das linhagens de *Xylella fastidiosa* foi extraído utilizando um método de extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas (Chen e Kuo, 1993).

3.3.7 Seqüenciamento automático de DNA

O DNA de interesse, clonado nos vetores TOPO (Invitrogen) ou pGEM (Promega), foi extraído com os sistemas de minipreparação de plasmídeo *QlAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN) ou Wizard Plus SV Miniprep (Promega), para seqüenciamento automático dos insertos, utilizando oligonucleotídeos direto e reverso que flanqueiam a região de clonagem dos plasmídeos. As reações foram feitas com 0,2 μg de cada minipreparação de DNA de plasmídeo, 3,2 pmol de um dos oligonucleotídeos, tampão fornecido pelo fabricante e 1 μl de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biossystems). As condições do PCR de seqüenciamento foram: 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. As reações foram precipitadas com isopropanol 75% e lavadas duas vezes com etanol 70%. O seqüenciamento automático foi feito em um aparelho ABI-3100 *DNA Sequencer*, pelo serviço de seqüenciados foram comparados com o banco de dados de seqüência de DNA (*GenBank*), usando o programa BLAST (Zhang e Madden, 1997).

3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

O fragmento *BamHI/EcoRI*de 670 bp (amplificado por PCR com os oligonucleotídeos Sigma24-1 e Sigma 24-2), contendo a região codificadora completa do gene *rpoE* de *X. fastidiosa* foi clonado no vetor de expressão pProEX HTc (Gibco BRL). Já o fragmento *BamHI/EcoRI*de 1.4 kb (amplificado por PCR com os oligonucleotídeos SIG1 e SIG2), contendo a região codificadora completa do gene *rpoN* e o fragmento *BamHI/EcoRI*de 1.0 kb (amplificado por PCR com os oligonucleotídeos Sigma32-P e Sigma32-2), contendo a região codificadora completa do gene *rpoH* de *X. fastidiosa* foram clonados no vetor de expressão pProEX HTb (Gibco BRL). Neste vetor também foi clonado o gene *piIR* (XF2545, ativador de σ^N). A região codificadora (1418 pb) foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos PiIR1 e PiIR2, clonada diretamente no vetor pGEM-Teasy (Promega) e subclonada com as enzimas BamHI/HindIII vetor pProEX HTb.

Clones de *E. coli* DH5a contendo as construções acima foram inoculados em 10 ml de meio LB com ampicilina a 37 °C até as culturas atingirem uma DO₆₀₀ nm=0.5. A expressão das proteínas recombinantes RpoE, RpoH, RpoN e PilR com cauda de histidina (His-RpoE, His-RpoH, His-RpoN e His-PilR) foi induzida com 0.5 mM de IPTG por 1 hora a 3 horas a 30 ℃ ou a 37 ℃, e amostras destas culturas foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em sistema descontínuo de pH, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Para verificar solubilidade das proteínas de fusão, as amostras acima foram sonicadas, centrifugadas e as frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado) foram submetidas à eletroforese. Para aumentar a quantidade de His-PilR solúvel foi utilizado um protocolo de indução alternativo: após adição de IPTG, as culturas foram mantidas durante 15 minutos a 37 ℃ e então transferidas para 22 ℃ por uma noite, sem agitação. Proteínas insolúveis foram purificadas de corpos de inclusão de E. coli DH5a após solubilização em sarkosil 0.3%, como descrito (Burgess e Knuth, 1996), seguido por cromatografia de afinidade em resina de níquel (GibcoBRL), como descrito pelo fabricante. Os passos de indução e purificação das proteínas foram acompanhados por SDS-PAGE.

A obtenção dos soros anti-RpoE e anti-RpoN foi feita por imunização de coelhos Nova Zelândia após quatro injeções subcutâneas de 0,5 mg das proteínas

purificadas em adjuvante de Freund. O teste dos soros foi feito por *immunoblotting* (*western blotting*) (Towbin *et* al., 1979) utilizando extratos de células de *X. fastidiosa*. A detecção foi feita utilizando os soros na diluição 1:1000 e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina na presença de *p-nitro-blue tetrazolium choride* (NBT) 0,3 mg/ml e *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (BCIP) 0,15 mg/ml.

3.5 CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO

Dois tipos de vetores foram construídos para tentar expressar genes em *Xylella fastidiosa*: um vetor para expressão constitutivamente alta e um vetor para expressão regulada. O vetor de expressão constitutiva foi construído pela clonagem do plasmídeo endógeno pXF1.3 e da região promotora do gene 16S rRNA da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa* no vetor pBluescriptKS de *E. coli*. A região promotora do gene 16S rRNA de *X. fastidiosa*, previamente clonada em nosso laboratório no vetor pSP1 (Da Silva Neto *et al.*, 2002), foi obtida por digestão com as enzimas Sacl/Xbal e clonada no vetor pBluescriptKS, gerando a construção KSp16S. O miniplasmídeo pXF1.3 foi obtido do vetor pSP3, previamente construído no laboratório (Da Silva Neto *et al.*, 2002), por digestão com Kpnl. Foi feita a ligação do fragmento de 1,3 Kb do pXF1.3 eletroeluído e digerido com Kpnl no KSp16S digerido com a mesma enzima e desfosforilado, gerando o vetor de expressão constitutiva KSp16SpXF1.3.

O vetor de expressão regulada para *Xylella fastidiosa* foi construído pela clonagem da região promotora do gene *bga* (XF0840) da β-galactosidase de *X. fastidiosa* no vetor híbrido pUCBM21pXF1.3, previamente construído em nosso laboratório. A região promotora do gene *bga* foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos Bga1 e Bga2 que amplificam uma região de 200 pb, clonada no vetor pCR4-TOPO, seqüenciada e subclonada no vetor híbrido pUCBM21pXF1.3 com as enzimas BamHI/NotI, gerando o vetor de expressão regulada pUCpXF1.3p*bga*.

As regiões codificadoras completas dos genes *rpoN* (XF1408), *rpoH* (XF2691) e *rpoE* (XF2239), incluindo o sítio de ligação ao ribossomo (RBS), mas sem a região promotora, foram amplificadas por PCR com os pares de oligonucleotídeos sigma54-1/sigma54-2, sigma32-1/sigma32-2 e sigma24-1/sigma24-2, clonadas no vetor pCR-

4TOPO e seqüenciadas. DNA dos clones TOPO*rpoN*, TOPO*rpoH* e TOPO*rpoE* foi digerido com as enzimas BamHI/EcoRI, separado em gel de agarose 1% e as bandas de 1470, 1030 e 670 pb, correspondentes aos genes *rpoN*, *rpoH* e *rpoE*, respectivamente, foram eletroeluídas e ligadas aos vetores de expressão KSp16SpXF1.3 e pUCpXF1.3p*bga*, digerido com as mesmas enzimas. As construções resultantes foram introduzidas em *Xylella fastidiosa* J1a12 por eletroporação, como descrito (Da Silva Neto *et al.*, 2002).

3.6 CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES

Um vetor para mutagênese por recombinação homóloga foi construído. Um fragmento de 400 pb, correspondente a origem de replicação do cromossomo (*oriC*) de *Xylella fastidiosa*, foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos Ori1 e Ori2 e clonado no vetor pUCBM21, gerando a construção pUCBM21*oriC*. A região interna dos genes *rpoE, rpoN* e *rpoH* foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos rpoE1/rpoE2, rpoN1/rpoN3 e rpoH1/rpoH2 e clonada diretamente no vetor pCR-4TOPO. Os fragmentos internos BamHI/ApaI, de 650 pb do gene *rpoN*, 450 pb do gene *rpoE* e 490 pb do gene *rpoH* foram retirados deste vetor por digestão e eletroeluição e foram clonados no vetor pUCBM21*oriC*, digerido com as mesmas enzimas. As construções resultantes foram introduzidas em *Xylella fastidiosa* J1a12 por eletroporação, como descrito (Da Silva Neto *et al.*, 2002).

Os transformantes foram selecionados em placas PWG/Amp e quatro colônias transformadas com o vetor pUCBM21*oriC* contendo a região interna de cada gene (*rpoN*, *rpoH* e *rpoE*) foram submetidas a sucessivos repiques. Estas culturas foram diluídas 1/10 a cada sete dias em 10 ml de meio PWG/Amp líqüido e este procedimento foi repetido várias vezes, cada vez consistindo em uma passagem. Ao longo das passagens, amostras de células foram utilizadas para detecção de integração dos plasmídeos nos genes de interesse, por PCR de colônia. Foram utilizados os pares de oligonucleotídeos Sigma54-1/M13Reverso, que gera uma banda de 1050 pb em caso de integração no gene *rpoN*, Sigma32-1/M13Reverso, que gera uma banda de 750 pb em caso de integração no gene *rpoH* e o par Sigma24-1/M13Reverso que origina uma banda de 670 pb em caso de integração no gene *rpoE*. Estes pares de oligonucleotídeos amplificam as bandas esperadas somente se tiver ocorrido integração nos genes alvo, pois hibridizam com

uma região no genoma fora do inserto clonado (oligonucleotídeos de cada gene) e outra região no vetor (oligonucleotídeo M13Reverso).

Uma vez verificada integração para os genes *rpoE* e *rpoN*, colônias isoladas foram obtidas e novamente confirmadas por PCR. Estas linhagens isoladas foram analisadas por *Southern blotting*, como descrito (Ausubel *et al.*, 1992), utilizando DNA genômico dos transformantes e da linhagem selvagem, digerido com EcoRI e fragmentos dos genes *rpoE* e *rpoN* marcados com [α^{32} P]-dCTP como sondas. As sondas (região codificadora completa dos dois genes) foram marcadas utilizando o método de iniciação aleatória (Feinberg e Vogelstein, 1993), purificadas com *Qiaquick PCR purification* (Qiagen) para remoção do [α^{32} P]-dCTP livre e incubadas por 16 horas a 37 °C com o DNA genômico fixado em membranas de *nylon*. As membranas foram lavadas com soluções SSC 2 X, SDS 0,1%; SSC 1 X, SDS 0,1% e SSC 0,1 X, SDS 0,1% (SSC 20 X: NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M), por 30 minutos a 37 °C, nas duas primeiras lavagens, e a 65 °C na última lavagem. Depois de secas, as membranas foram expostas a filme radiográfico (Kodak) por 24 horas a -70 °C e foi feita revelação em sala escura para detecção do sinal.

A linhagem mutante rpoE foi complementada com uma cópia do gene rpoE em trans no vetor pUCBM21 oriC, contendo um cassete de resistência a canamicina, isolado do vetor pUC4K. O gene rpoE completo foi amplificado por PCR a partir do genoma da linhagem J1a12, utilizando os oligonucleotídeos Sigma24C1 e XF2240EXT, que amplificam um inserto compreendendo guase 500 pb de região intergênica a 5' do códon de início de tradução até 20 pb depois do códon de parada de tradução do gene rpoE. O produto de PCR foi clonado diretamente no vetor pCR-4TOPO, sequenciado e o inserto Pstl/HindIII de 1160 pb foi isolado deste vetor e clonado no pUCBM21oriC, gerando a construção pUCoriC(rpoE). DNA do vetor pUC4K foi digerido com EcoRI, separado em gel de agarose 1% e a banda de 1200 pb, correspondente ao cassete de resistência a canamicina do transposon Tn903, foi eletroeluída ligada vetor pUCoriC(*rpoE*), gerando а е ao construção pUCoriC(rpoE)Can. Esta construção foi introduzida no mutante rpoE por eletroporação e os transformantes foram selecionados em plaças PWG/Amp/Can. Confirmação adicional das linhagens mutantes e da linhagem complementada foi feita por *immunoblotting* utilizando os soros anti-RpoE e anti-RpoN.

3.7 ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS LINHAGENS MUTANTES

3.7.1 Testes de sobrevivência

Para realização dos testes de sensibilidade a choque térmico, as linhagens J1a12, *rpoE* e *rpoE*⁺ foram cultivadas em meio PWG até fase logarítmica (DO₆₀₀=0,5). Alíquotas das três culturas mantidas a 25 °C (tempo zero) e incubadas em banho-maria a 45 °C nos tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos foram retiradas e plaqueadas em diferentes diluições para contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs), após 21 dias de incubação em PWG a 25 °C. Os resultados são expressos como porcentagem de UFC em relação ao tempo zero (antes da exposição ao estresse). Para testar resistência a etanol e a estresse salino, culturas das linhagens J1a12 selvagem e do mutante *rpoE* foram diluídas (DO_{600 nm}=0,1) e cultivadas em PWG na ausência e na presença de etanol 1,5% ou NaCl 0,5%. O crescimento das culturas foi acompanhado pela leitura da absorbância a 600 nm.

3.7.2 Ensaio de formação de biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado como previamente descrito (Souza *et al.*, 2006). Culturas da linhagem selvagem e do mutante *rpoN* foram diluídas (DO_{600 nm}=0,1) e cultivadas em tubos de polipropileno (2 ml PWG por tubo) a temperatura ambiente, sem agitação. Após 8, 14, 21 e 31 dias de cultivo, as células em suspensão foram removidas e as paredes dos tubos lavadas três vezes com água. O biofilme formado nos tubos foi corado com cristal violeta 0,1% por 1 minuto e o excesso foi lavado com água. O cristal violeta foi removido por lavagem com solução etanol:acetona (20:80) e quantificado em espectrofotômetro DO_{600 nm}.

3.7.3 Ensaio de twitching motility

Os ensaios de *twitching motility* foram feitos como descrito para *Pseudomonas aeruginosa*, para visualização das zonas de expansão da colônia na superfície de contato entre a placa e o ágar (Mattick, 2002). Culturas da linhagem selvagem J1a12 e do mutante *rpoN* foram inoculadas com ponteira através do ágar até o fundo da placa em meio PWG. Após incubação por 20 dias a 25 °C, o ágar foi retirado e as células retidas na placa foram coradas com *Coomassie Blue* 0,05% (metanol 50%, ácido acético 10%), para melhor visualização da zona de motilidade.

3.7.4 Ensaio de auto-agregação

Para estudar auto-agregação das células de *X. fastidiosa*, as linhagens J1a12 e *rpoN* foram cultivadas em 50 ml de meio PWG em frascos de 250 ml. Após 18 dias de incubação sem agitação a 25 °C, as culturas foram agitadas lentamente e a formação de agregados de células no meio líquido foi avaliada por observação visual. Amostras foram recolhidas das culturas líqüidas, transferidas para placas de Petri e fotografadas, como descrito (Kang *et al.*, 2002).

3.7.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Microscopia eletrônica de transmissão foi usada para examinar fímbrias de *Xylella fastidiosa.* A linhagem selvagem J1a12 e a linhagem mutante *rpoN* foram cultivadas em meio PWG durante 7 a 10 dias. As células, provenientes da superfície do ágar ou de culturas líquidas, foram lavadas com PBS e negativamente coradas com solução aquosa de ácido fosfotungstíco 2% pH 7,4 (Totten *et al.*, 1990). Uma gota desta suspensão foi aplicada em uma tela de níquel revestida com carbono e após 20 segundos o excesso foi retirado com papel de filtro. As amostras foram examinadas com o microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 do Setor de Microscopia Eletrônica do ICB-USP, operando a 80 kV. Estes experimentos foram feitos em colaboração com a doutora Cecília M. Abe, do Instituto Butantan.

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Os RNAs utilizados nos diversos experimentos foram extraídos com reagente Trizol (Invitrogen). As células congeladas em gelo seco foram lisadas imediatamente em 1 ml de Trizol, incubadas a 65 °C por 10 minutos e em seguida foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada invertendo os tubos por 15 segundos, em seguida, incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12000 x g. A fase aquosa foi coletada e o RNA foi precipitado com 0,5 ml de isopropanol por 1 hora a -70 °C. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 75%. O precipitado foi seco por 30 minutos a temperatura ambiente, solubilizado por 10 minutos a 60 °C em 50 μ l de água milliQ tratada com DEPC e armazenado a -70 °C.

Para eliminar qualquer contaminação com DNA, os RNAs obtidos foram tratados com 0,6 U de RQ1 DNAse (Promega) em seu próprio tampão fornecido pelo fabricante em um volume final de 100 µl, durante 30 minutos a 37 °C. Os RNAs foram extraídos com fenol (pH 5,2), seguido de clorofórmio, precipitados com etanol e acetato de sódio e ressuspendidos em água milliQ tratada com DEPC. A qualidade e a quantidade dos RNAs foram avaliadas por absorbância a 260 nm e eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante (MOPS 1 X, formaldeído 6,5%).

3.9 MICROARRANJOS DE DNA

Cinco conjuntos de experimentos comparativos do perfil de expressão gênica global por microarranjo de DNA foram realizados: comparação da linhagem selvagem J1a12 ao mutante *rpoE* com RNA de culturas cultivadas em PWG a 25 °C; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoE* com RNA de culturas cultivadas em PWG a 25 °C e submetidas a choque de calor 40 °C por 25 minutos; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em PWG; comparação da linhagem J1a12 ao mutante *rpoN* com RNA de culturas cultivadas em ZDM₂ e submetidas a carência de nitrogênio por 2 horas; e comparação temporal do perfil de expressão de células da linhagem J1a12 após 2 horas, 8 horas e 12 horas em carência de nitrogênio (XDM₀) em relação ao meio XDM₂. Os RNAs foram extraídos de pelo menos três culturas biológicas independentes de cada linhagem.

Foram utilizadas para os experimentos lâminas contendo 6152 fragmentos internos de DNA amplificados por PCR, correspondentes a 2692 ORFs anotadas do genoma da linhagem 9a5c de *Xylella fastidiosa* (94.5% das 2848 ORFs totais do genoma), depositados pelo menos em duplicata (Koide *et al.*, 2004a). Os experimentos de microarranjo de DNA foram feitos em colaboração com a doutora Tie Koide e a professora doutora Suely Lopes Gomes, utilizando a infra-estrutura do laboratório do Projeto CAGE do Instituto de Química da USP.

3.9.1 Preparação das sondas de cDNA marcadas com os fluoróforos

A síntese das sondas de cDNA para hibridização nas lâminas de microarranjo de DNA foi feita utilizando o SuperScript Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. O cDNA das amostras controle e o cDNA das amostras experimentais foram marcados separadamente com os fluoróforos Alexa Fuor 555 Reactive Dye, que corresponde ao Cy3 ou Alexa Fuor 647 Reactive Dye, que corresponde ao Cy5. Resumidamente, cerca de 25 µg de RNA tratado com DNAse foi convertido a cDNA utilizando oligonucleotídeos randômicos, mistura de dNTPs, incluindo o amino-alil nucleotídeo AA-dUTP para acoplamento dos fluoróforos, inibidor de RNAse e transcriptase reversa, num volume final de 30 µl. A reação ocorreu a 42 °C por três horas. A remoção do mRNA foi feita através de degradação por hidrólise alcalina, adicionando 15 µl de NaOH 1 M (10 minutos a 70 °C), seguido de neutralização com 15 µl de HCl 1 M. As sondas de cDNA foram purificadas em placas de filtração de 96 poços Multiscreen MAFOB (Millipore) através de quatro lavagens com etanol 80% e eluição com 90 µl de tris 10 mM pH 8,0. O acoplamento dos fluoróforos ao cDNA foi feito em tampão de acoplamento fornecido pelo fabricante por uma hora, a temperatura ambiente, no escuro. As amostras foram purificadas, como descrito acima e quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm (para medir síntese do cDNA) e a 550 nm e 650 nm (para verificar incorporação de Alexa Fuor 555 Reactive Dye ou Alexa Fuor 647 *Reactive Dye*, respectivamente).

3.9.2 Hibridização e lavagens

As sondas de cDNA marcadas com *Alexa Fuor 555 Reactive Dye* e *Alexa Fuor 647 Reactive Dye* foram ressuspendidas em 6,75 µl de água cada uma, misturadas com 13,5 µl da tampão de hibridização e 27 µl de formamida e incubadas por 2 minutos a 92 °C. Estes 54 µl totais foram aplicados em uma das extremidades da lâmina, espalhados pela cobertura com lamínula e colocados para hibridizar em câmara úmida por 16 horas a 42 °C. Após hibridização, as lâminas foram lavadas por 10 minutos a 55 °C, com SSC 1 X, SDS 0,2%; SSC 0,1 X, SDS 0,2% e SSC 0,1

X, SDS 0,2%, mergulhadas em SSC 0,1 X e em água e secadas com nitrogênio líquido.

3.9.3 Aquisição das imagens e análise e normalização dos dados

A leitura das fluorescências das sondas foi realizada utilizando o *Generation III DNA scanner* (GE Healthcare), e os valores de intensidade de fluorescência de cada ponto foram extraídos utilizando o programa *ArrayVision*, versão 6,0 (Imaging Research, Inc.). A normalização foi feita pelo método LOWESS (<u>lo</u>cally <u>w</u>eighted regre<u>ss</u>ion), assumindo como hipótese que a maioria dos genes não deve apresentar diferença entre as duas condições (Yang *et al.*, 2002). Para determinar os genes diferencialmente expressos foram utilizados valores de corte dependente da intensidade, baseados em experimentos controle de hibridizações homotípicas, como descrito (Vêncio e Koide, 2005). Um gene foi classificado como diferencialmente expresso se pelo menos 75% de suas réplicas estavam fora da curva de corte, utilizando pelo menos três réplicas.

Os dados dos experimentos de microrranjo de DNA que já foram publicados estão depositados no banco de dados GEO (*Gene Expression Omnibus*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) (Ball *et al.*, 2004). Os números de acesso são GSE4960, para os dados do mutante *rpoE* e GSE8097, para os dados do mutante *rpoN*.

3.10 RT-PCR QUANTITATIVO (qRT-PCR)

Os oligonucleotídeos utilizados para qRT-PCR (Tabela 3) foram desenhados com o programa *PrimerExpress* (Applied Biosystems), de modo a obter produtos de PCR pequenos (em torno de 100 pb). Alguns experimentos foram feitos por qRT-PCR *one step*, usando o *Absolute qRT-PCR SYBRgreen Mix* (ABgene). Reações foram feitas com 250 ng de RNA pré-tratado com DNAsel, 0.1 µM de cada oligonucleotídeo e 12,5 µl de *SYBRgreen Mix*. As condições utilizadas foram: 47 °C por 30 min; 95 °C por 15 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min.

Para a maioria dos experimentos foi utilizado qRT-PCR *two step*, ou seja, síntese de cDNA total separada das reações de PCR em tempo real.

Aproximadamente 5 μ g de RNA pré-tratado com DNAsel foi usado como molde para síntese do cDNA total com 50 ng de hexâmeros randômicos, usando o *Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. O PCR em tempo real foi feito usando 50 ng de cDNA, 0.1 μ M dos oligonucleotídeos específicos para cada gene e 12.5 μ l de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Condições usadas foram: 50 °C por 2 min; 95 °C por 2 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min. A fluorescência foi medida durante o passo de anelamento e extensão e a análise do PCR em tempo real foi feita utilizando o *7500 System SDS Software* V 1.2.2. fornecido pelo fabricante do termociclador (*7500 Real Time PCR System*, Applied Biosystems). Em todos os experimentos foram realizadas curvas de dissociação das reações para confirmar a ausência de dímeros e produtos inespecíficos. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método do 2⁻ $\Delta \Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001) utilizando o gene dnaQ (XF2157) como controle endógeno.

Gene	Oligo direto	Seqüência (5' - 3')	Oligo reverso	Seqüência (5' - 3')
XF2157	XF2157F	Ggtgccgaactgattattcaca	XF2157R	caaccgcgataactcgtaatcaa
XF2239	XF2239-1F	atggccgaaacaaacaacc	XF2239-126R	tccgatcagggcaatgactc
XF2240	XF2240-589F	atacaaaccaaaccctggccg	XF2240-705R	ttctgggagtcgtggttcgaa
XF2241	XF2241-856F	gctgccgaacaaatccgtaa	XF2241-985R	tgttattgaccagtgcgcctc
XF0644	XF0644-186F	cgcctacagcaaaaagcaacc	XF0644-305R	gctgctttatcgtattcggcc
XF2594	XF2594-818F	cacgtgctgagcaactcaaga	XF2594-933R	caacggattagcaggaacacc
XF0167	XF0167-451F	cgcgaagcaggtttatcacca	XF0167-578R	cgccaagtttcatccatcacc
XF0285	XF0285-843F	attggtcacgaaaggcgttg	XF0285-953R	actaatgcgccgtgtggatt
XF1514	XF1514-195F	cgcattattgacagcatccg	XF1514-306R	tgtatttccagtgcctgctgc
XF2542	XF2542J1F	agccatcactacaccggaaac	XF2542J1R	gtaatcgtacatacgatggtgc
XF2539	XF2539F	ccatcgcttgggatcgtacc	XF2539R	gtctcagtgcatcggaggtg
XF0539	XF0539F	gggctttcgtcggtggaaag	XF0539R	tagtcggttgcgttgcttcg
XF0487	XF0487F	tcgggcatcgcacaacaa	XF0487R	caaatcggccatacgaagccat
XF1791	XF1791-F	tcttacggcgatcatgctgc	XF1791-R	ggttgctcattacaggctcg
XF0083	XF0083F	gctcgtacaccgttcaccatt	XF0083R	gggcctggctcaaaataggt

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR quantitativo.

3.11 ANÁLISE DA UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO XF2239-XF2240-XF2241

XF2239 XF2240 Co-transcrição entre е foi analisada com OS oligonucleotídeos XF2239-1F/XF2240-705R (banda de 1322 pb), enquanto cotranscrição entre XF2240 e XF2241 foi analisada com os oligonucleotídeos XF2240-589F/XF2241-984R (banda de 1226 pb). Reações foram feitas com 1 µg de RNA pré-tratado com DNAsel isolado de células da linhagem J1a12 cultivada a 25 °C ou 40 °C, usando SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen), de acordo com а instruções do fabricante. As condições para as reações de RT-PCR foram: 25 minutos a 50 °C e 2 minutos a 94 °C, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 ℃ e 1 minuto e 30 segundos a 72 ℃, com um passo final de 7 minutos a 72 °C. Reações controle foram feitas apenas com Taq DNA polimerase (Invitrogen) para garantir que não há amplificação devido à presença de DNA nas amostras.

3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA σ^{E} EM RESPOSTA A ESTRESSES

Xylella fastidiosa J1a12 foi inoculada em 50 ml de PWG e após 6 dias de cultivo (DO_{600 nm}= 0,5) a cultura foi dividida em várias alíquotas, submetidas às seguintes condições de estresse: choque térmico a 43 °C em banho-maria; etanol 3% (v/v); NaCl 250 mM; Sacarose 300 mM; choque frio 10 °C e zinco 0,5 mM. Alíquotas de cada cultura foram retiradas antes da exposição aos estresses (tempo 0) e com 15, 30, 60 e 120 minutos após a exposição aos estresses. As culturas foram centrifugadas, as proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida-SDS 12% (Laemmli, 1970) e os níveis da proteína σ^{E} foram avaliados por *immunoblotting* (Towbin *et al.*, 1979), utilizando o soro anti-RpoE de *X. fastidiosa*.

3.13 MAPEAMENTO DOS SÍTIOS DE INÍCIO DE TRANSCRIÇÃO

Cerca de 100 pmol dos oligonucleotídeos M13direto, XF0644EXT, XF2594EXT, XF0167EXT, XF2239EXT, XF2240EXT, XF1694EXT, XF2542EXT e XF1842EXT (Tabela 4), foram marcados com 30 μ Ci de [γ ³²P]-ATP, utilizando 10 U da enzima T4 Polinucleotídeo Quinase (Invitrogen), conforme instruções do

fabricante. Ensaio de extensão de oligonucleotídeo foi feito como descrito (Ausubel *et al.*, 1992). Resumidamente, cerca 10^7 cpm de cada oligonucleotídeo marcado foram hibridizados a 55 °C por 16 horas com 50 µg de RNA total isolado de células das linhagens J1a12, *rpoE* e *rpoE*⁺ de culturas a 25 °C ou submetidas a choque de calor 40 °C 25 minutos (para os genes do regulon σ^E) ou de células das linhagens J1a12 e *rpoN* cultivadas em PWG (para genes do regulon σ^N). Após hibridização foi feita transcrição reversa, degradação do RNA e separação do cDNA em gel de poliacrilamida-uréia 6%. O tamanho dos produtos de extensão foi determinado por comparação com reações de seqüência de DNA simples fita do bacteriófago M13, obtidas por reações de seqüenciamento manual com o *kit Thermosequenase Cycle Sequencing* (USB), utilizando o oligonucleotídeo M13direto marcado.

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência (5' - 3')
	M13direto	GTAAAACGACGGCCAGT
XF0644	XF0644EXT	CAGACGCAACTTCATCAA
XF2594	XF2594EXT	GAAGCTCCTGTCACGAAATTCTGG
XF0167	XF0167EXT	GGATGATTGTGGCAATTAATGCGC
XF2239	XF2239EXT	TCGATATCTAGGGACTGAGG
XF2240	XF2240EXT	CCCAAGCTTTTTCGGACAGATGGTTGC
XF1694	XF1694EXT	TCGATCTCATGGATTTCAAGTTCAC
XF2542	XF2542EXT	GACGATCATCAGCTCGATCAAAGTG
XF1842	XF1842EXT	AACAAAGCGCAAATCGACGAATTCG

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de extensão de oligonucleotídeo.

O método de 5' RACE (do inglês <u>rapid amplification of cDNA end</u>) foi utilizado para confirmar o início de transcrição do gene *rpoE* (XF2239), utilizando o *kit* 3'/5' RACE (Roche), conforme instruções do fabricante. O RNA total foi extraído da linhagem J1a12 de células cultivadas até fase logarítmica a 25 °C, tratado com DNasel (Promega) e a transcrição reversa foi feita utilizando o oligonucleotídeo específico XF2239SP1. O cDNA resultante foi purificado com o *kit Qiaquick PCR purification* (Qiagen), uma cauda poli-A foi adicionada e foi feita amplificação por PCR com os oligonucleotídeos dT-ancorado e XF2239-126R (SP2). O produto de PCR resultante foi clonado no vetor TOPO (Invitrogen) e seqüenciado utilizando oligonucleotídeos M13 universais.

3.14 ENSAIO DE ALTERAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Toda a região promotora do gene *pilA* e o início de sua região codificadora foi amplificada por PCR a partir do genoma da linhagem J1a12, com enzima de alta fidelidade, utilizando os oligonucleotídeos 2542-9a5cshiftFw e 2542-J1a12shiftRv (Tabela 2), que amplificam um produto de 640 pb. O produto de PCR foi eletroeluído de gel de agarose, segui-se adição de adenina às suas extremidades com enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e clonagem direta no vetor pGEM-Teasy (Promega). DNA plasmidial de quatro clones pGEM*pilA* foi extraído com *QIAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN) para o seqüenciamento automático do inserto de 640 nt.

A sonda da região promotora do gene *pilA* foi gerada por PCR, utilizando 0,1 μ M dos oligonucleotídeos 2542-9a5cshiftFw e 2542-J1a12shiftRv (este último marcado com [γ ³²P]-ATP, como descrito no item 3.13), 0,5 μ g de DNA do clone pGEM*pilA* seqüenciado, 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 2 mM, 1 X tampão PCR fornecido pelo fabricante e 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O produto de PCR radioativo foi eletroleluído de gel de agarose, precipitado, ressuspendido em 20 μ I de água e 1 μ I foi retirado para a determinação da quantidade de cpm em contador de cintilação.

Para o ensaio de ligação, várias quantidades da proteína His-PiIR purificada (0, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 nM) foram incubadas com 1 µg de DNA inespecífico poli-dldC (USB) e 200 ng do fragmento de 640 pb da região promotora de *pilA* marcado com [γ ³²P]-ATP em tampão de interação (Tris-HCl 10 mM pH 8, KCl 40 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, BSA 100 µg/mL, glicerol 10%) durante 20 minutos a 25 °C. Ao volume final de 20 µL de cada amostra foi adicionado 3 µL de glicerol 50% e as amostras foram carregadas em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante. A corrida do gel foi realizada em TBE 1 X, por 3 horas a 30 mA a 4 °C. O gel foi seco e visualizado por exposição a um filme de raio X.

3.15 BUSCA IN SILICO DE ELEMENTOS CONSERVADOS DOS PROMOTORES

Para tentar determinar o conjunto de prováveis sítios de ligação de σ^{54} na seqüência do genoma de *X. fastidiosa* 9a5c, foi feita uma análise por método computacional. Regiões de 400 nucleotídeos a montante do códon de início de

tradução (-400 a -1) de todas as ORFs do genoma foram analisadas com o módulo PATSER do *Regulatory Sequence Analysis Tools* (RSAT) [http://rsat.ulb.ac.be/rsat/] para presença da seqüência consenso -24/-12 do promotor σ^{54} . O programa fornece *scores* para as seqüências com base em uma matriz de peso (Tabela 5) gerada a partir de 186 promotores dependentes de σ^{54} caracterizados em diferentes bactérias (Barrios *et al.*, 1999). Foram mantidos apenas os sítios localizados em regiões intergênicas e que potencialmente transcrevem um gene na orientação correta, com *scores* acima de 8.9.

	Т	G	G*	С	А	С	G	Ν	Ν	Ν	Ν	Т	Т	G	C*	W
			-24												-12	
А	12	2	0	12	139	11	55	51	46	44	38	13	4	1	9	76
С	14	0	0	147	23	122	17	48	64	42	62	22	18	2	173	5
G	10	184	186	6	18	10	103	69	36	35	43	15	10	181	1	17
Т	150	0	0	21	6	43	11	18	40	65	43	136	154	2	3	88

Tabela 5: Matriz de peso baseada em 186 promotores dependentes de σ^{54} caracterizados em diferentes bactérias.

^{*} Posição em relação ao início de transcrição. Os elementos GG e GC, localizados nas posições -24/-12, são os mais conservados do consenso e estão destacados em negrito. N indica qualquer base. W indica A/T.

Para σ^{E} foi feita uma busca manual usando como parâmetros a seqüência AAC-16/17 nt-TnnnA, obtida a partir do alinhamento da seqüência de nucleotídeos de alguns promotores dependentes de σ^{E} de *X. fastidiosa* mapeados experimentalmente. A busca para esta seqüência foi realizada manualmente em 300 nt a montante do ATG anotado dos genes identificados como regulados por σ^{E} nas análises de microarranjo de DNA.

4 RESULTADOS

A següência completa do genoma de um organismo e a anotação das ORFs encontradas fornecem um panorama geral das possibilidades e das restrições às quais o organismo pode responder, permitindo uma série de inferências a respeito de sua biologia. No caso de genes regulatórios, a presença de uma dada ORF no genoma nos leva a acreditar que os genes por ela regulados também estejam presentes. Uma busca na página do Projeto Genoma de Xylella fastidiosa (http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf), que sumariza as informações a respeito da següência completa do genoma da linhagem de citros 9a5c de Xylella fastidiosa (Simpson et al., 2000), permitiu encontrar quatro ORFs anotadas como fatores sigma bacterianos. A Tabela 6 apresenta as principais informações a respeito destas ORFs com base nos dados derivados da anotação primária. A ORF XF2239 foi anotada com o nome de algU, devido sua similaridade com o gene algU de P. aeruginosa, um ortólogo do gene rpoE de E. coli. No entanto, ela será tratada aqui como rpoE e a proteína correspondente como σ^{E} , mantendo a nomenclatura padrão mais utilizada na literatura para fatores sigma de bactérias Gram-negativas, que é derivada dos fatores sigma de E. coli.

Tabela	6:	As	quatro	ORFs	anotadas	como	fatores	sigma	bacterianos	no	genoma	da
linhager	n 9a	a5c	de Xyle	lla fasti	diosa.							

OREs	Nome do	Nome da	Tamanho do	Tamanho da	Peso
01113	gene	proteína	gene	proteína	Molecular
XF1350	rpoD	σ^{70}	1857 pb	618 aa	69,9 kDa
XF2691	rpoH	σ^{32}	882 pb	293 aa	33,3 kDa
XF2239	rpoE	$\sigma^{^{24}}$ ou $\sigma^{^{E}}$	621 pb	206 aa	24,1 kDa
XF1408	rpoN	$\sigma^{^{54}}$ ou $\sigma^{^{N}}$	1386 pb	462 aa	51,5 kDa

Uma análise mais detalhada das proteínas codificadas por estes quatro genes de *X. fastidiosa* revelou a presença de domínios conservados característicos de fatores sigma. A proteína RpoN possui todos os domínios típicos de fatores sigma da família σ^{54} , incluindo um domínio carboxi-terminal de ligação ao DNA (pfam04552), contendo um motivo hélice volta hélice (HTH) e uma região altamente conservada, conhecida como RpoN Box, típico de proteínas sigma54; um domínio central de ligação ao cerne da RNA polimerase (pfam04963); e um domínio aminoterminal de interação e ativação, responsável por inibir a transcrição pela holoenzima contendo σ^{54} na ausência de proteínas ativadoras (pfam00309) (Buck *et al.*, 2000). Os três outros genes (XF1350, XF2691 e XF2239) codificam proteínas que possuem domínios característicos de membros da família σ^{70} , como o domínio sigma70_r2 (pfam04542), que corresponde à região mais conservada da proteína, contendo a hélice de reconhecimento ao consenso –10 do promotor e o determinante de ligação ao cerne da RNA polimerase, e o domínio sigma70_r4 (pfam04545), envolvido na ligação ao elemento –35 do promotor (Wosten, 1998; Paget e Helmann, 2003).

Assim, *Xylella fastidiosa* possui um fator sigma pertencente à família σ^{54} , o fator σ^{N} ou σ^{54} , codificado pelo gene *rpoN* (XF1408), e três fatores sigma pertencentes à família σ^{70} , sendo um fator sigma primário codificado pelo gene *rpoD* (XF1350), e dois fatores sigma alternativos, o fator sigma de choque térmico σ^{32} , codificado pelo gene *rpoH* (XF2691) e o fator sigma de função extracitoplasmática (ECF) σ^{E} , codificado pelo gene *rpoE* (XF2239). Como o fator primário σ^{70} é responsável pela transcrição da maioria dos genes da bactéria crescendo em condições normais, os chamados genes de manutenção, sendo, portanto essencial, ele não será tratado neste trabalho. Daqui em diante trataremos apenas dos três fatores sigma alternativos de *Xylella fastidiosa* (σ^{32} , σ^{N} e σ^{E}), com a intenção de determinar o conjunto de genes regulados por cada um deles.

As ORFs completas dos três fatores sigma alternativos anotados no genoma seqüenciado da linhagem 9a5c de *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico da linhagem J1a12 e clonadas no vetor pCR 4-TOPO para serem seqüenciadas. O fato de trabalharmos com a linhagem J1a12, ao invés da 9a5c, a linhagem que foi seqüenciada, é porque a linhagem 9a5c é refratária à transformação, e portanto as técnicas de manipulação genética desenvolvidas até o momento para linhagens CVC funcionam para J1a12, mas não para 9a5c (Da Silva Neto *et al.*, 2002; Gaurivaud *et al.*, 2002). Entretanto, embora a linhagem J1a12 seja passível de manipulação genética, ela não é patogênica.

DNA plasmidial das construções TOPOrpoN, TOPOrpoH e TOPOrpoE foi seqüenciado e as seqüências obtidas foram comparadas com as ORFs

correspondentes do genoma da linhagem 9a5c, utilizando o programa BLASTN para alinhamento de duas seqüências. Para o gene *rpoE* as seqüências obtidas foram idênticas nas linhagens J1a12 e 9a5c, para o *rpoH* houve a troca de uma adenina por uma guanina 11 pares de bases depois do códon de terminação e para o gene *rpoN* houve a troca de uma timina por uma citosina na região central do gene, que leva a substituição de uma treonina por uma alanina. Estas duas substituições encontradas provavelmente não se devem a erros de incorporação da polimerase durante o PCR, porque foi utilizada uma polimerase de alta fidelidade e as reações foram repetidas diversas vezes. Embora os fatores sigma sejam bastante conservados e as linhagens J1a12 e 9a5c sejam ambas linhagens CVC, é possível que estas substituições sejam reais. Comparando as seqüências de nucleotídeos das linhagens 9a5c (uma linhagem de citros) e Temecula (uma linhagem de uva) encontramos 18 substituições de nucleotídeos para o gene *rpoH* e 7 para o gene *rpoE*, muitas delas resultando em substituição de aminoácidos.

4.1 OBTENÇÃO DE FERRAMENTAS GENÉTICAS PARA O ESTUDO DOS FATORES SIGMA ALTERNATIVOS DE *Xylella fastidiosa*

4.1.1 Construção de vetores de expressão para Xylella fastidiosa

Como não foi descrito ainda nenhum vetor de expressão para linhagens CVC de *Xylella fastidiosa*, tentamos construir tais vetores com base nos dados obtidos em nosso laboratório de que o miniplasmídeo pXF1.3, encontrado na linhagem seqüenciada 9a5c, pode ser usado para construção de vetores híbridos estáveis em *Xylella fastidiosa* (Da Silva Neto *et al.,* 2002). Foram construídos dois vetores baseados no pXF1.3, que diferem quanto ao tipo de região promotora endógena de *Xylella* clonada no vetor para dirigir a expressão dos genes a serem expressos: no vetor de expressão constitutiva foi utilizada a região promotora do gene 16S rRNA e no vetor de expressão regulada a região promotora do gene *bga.* Os dois vetores foram construídos de modo a permitir a clonagem orientada das ORFs completas dos três fatores sigma alternativos, sem promotor, mas contendo o sítio de ligação ao ribossomo, nos sítios de BamHI e EcoRI, adicionados nas extremidades dos três genes durante o PCR (Figura 5).



Figura 5: Construção de vetores de expressão para Xylella fastidiosa. (A). Construção de um vetor de expressão constitutiva. O vetor construído contem uma origem de replicação para *Xylella* (pXF1.3), a origem de replicação do pBluescriptKS para *E. coli* e a região promotora do gene 16S rRNA de *Xylella*, para dirigir a expressão dos fatores sigma. As setas internas indicam a orientação das ORFs. **(B).** Construção de um vetor de expressão regulada. O vetor construído contem uma origem de replicação para *Xylella* (pXF1.3), a origem de replicação dos pUCBM21 para *E. coli* e a região promotora do gene *bga* de *Xylella*, para dirigir a expressão dos fatores sigma. As origem de replicação do pUCBM21 para *E. coli* e a região promotora do gene *bga* de *Xylella*, para dirigir a expressão dos fatores sigma. As setas internas indicam a orientação das ORFs.

Um esquema do vetor de expressão constitutiva KSp16SpXF1.3 está apresentado na Figura 5A. Ele consiste do plasmídeo pXF1.3 e da região promotora do gene 16S rRNA da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa*, clonados no vetor pBluescriptKS de *E. coli*. A clonagem orientada das ORFs completas dos três fatores sigma alternativos neste vetor apresentou graus diferentes de dificuldade: para o gene *rpoN* foram obtidos dois clones positivos em 48 analisados, para o gene *rpoE* foram obtidos três clones positivos em 4 analisados e para o gene *rpoH* não conseguimos a clonagem mesmo após análise de 64 colônias, de diferentes transformações.

Eletroporação do vetor de expressão constitutiva vazio na linhagem J1a12 de *Xylella fastidiosa* gerou colônias após 20 dias em placas PWG com ampicilina, mas as construções com os genes *rpoN* e *rpoE* clonados neste vetor não deram nenhuma colônia, mesmo em três experimentos independentes de eletroporação. Estas dificuldades de clonar os genes já em *E. coli*, no caso dos genes *rpoN e rpoH*, e a incapacidade de gerar qualquer colônia em *X. fastidiosa* deve resultar de uma expressão muito elevada destas proteínas pelo promotor 16S rRNA, causando efeito deletério para as células, pois o vetor sem os fatores sigma transformou bem *Xylella*. Esta mesma região promotora foi utilizada com sucesso para dirigir a expressão do gene de resistência a canamicina sem promotor (Da Silva Neto *et al.,* 2002; Monteiro *et al.,* 2001b). No entanto, no caso do gene de resistência a canamicina sem promotor (Da Silva Neto *et al.,* 2002; Monteiro *et al.,* 2001b). No entanto, no caso do gene de resistência a canamicina enquanto a super-expressão dos fatores sigma deve causar uma grande alteração no perfil de expressão da célula pelo fato de serem genes regulatórios.

Diante da incapacidade de expressar os fatores sigma no vetor KSp16SpXF1.3, tentamos construir um vetor de expressão regulada para X. *fastidiosa*. Um dos poucos genes de *X. fastidiosa* em que há dados experimentais demonstrando regulação da expressão é o gene *bga*, que codifica para uma beta-galactosidase similar a beta-galactosidases de eucariotos. Foi demonstrado que a expressão deste gene é reprimida pela fitona peptona, um dos componentes do meio PWG (Gaurivaud *et al.*, 2002), sugerindo que sua região promotora poderia ser utilizada na montagem de um vetor de expressão regulada para *Xylella*. A repressão de ste gene pela fitona peptona foi confirmada pela adição de X-gal a colônias de J1a12 cultivadas em meio PWG e PWG sem fitona. Nas placas PWG sem fitona as colônias tornaram-se azuis algumas horas após a adição de X-gal, indicando degradação do substrato pela beta-galactosidase, enquanto nas placas PWG as colônias permaneceram brancas após acompanhamento por vários dias, confirmando que este gene é realmente reprimido pela fitona peptona do meio PWG (dados não mostrados).

Assim, o vetor de expressão regulada para *X. fastidiosa* pUCpXF1.3p*bga* foi construído pela clonagem da provável região promotora do gene *bga* da β-galactosidase de *Xylella* (uma região de 200 pb a montante da ORF XF0840, que codifica para o gene *bga*) no vetor híbrido pUCBM21pXF1.3, previamente construído em nosso laboratório (Figura 5B). Este vetor foi digerido com as enzimas BamHI e EcoRI e as ORFs completas dos três sigmas sem a região promotora foram clonadas de modo orientado.

Como o gene bga mostrou ser reprimido no meio de cultura PWG, esperávamos que o vetor de expressão regulada pUCpXF1.3pbga sozinho e com os três sigmas clonados gerassem colônias quando eletroporados na linhagem J1a12 de Xylella fastidiosa, pois a região promotora estaria sendo reprimida e só seria expressa quando as colônias fossem transferidas para placas PWG sem fitona com o antibiótico de seleção. No entanto, apenas o vetor de expressão vazio pUCpXF1.3pbga gerou colônias quando eletroporado na linhagem J1a12 de Xylella fastidiosa. As construções com os genes rpoN, rpoH e rpoE clonados neste vetor não deram nenhuma colônia, mesmo em três experimentos independentes de eletroporação. Neste caso, não temos um promotor muito forte dirigindo a expressão dos sigmas e nas condições testadas este promotor deveria estar sendo reprimido. Assim, a ausência de colônias pode ser devido a algum vazamento de expressão ou porque o mecanismo de repressão não atua na região de 200 pb clonada no vetor. Outra explicação para esta ausência de colônias seria pelo fato de estarmos utilizando o plasmídeo pXF1.3, um vetor que existe em múltiplas cópias em Xylella fastidiosa, o que poderia estar causando a expressão de níveis elevados das proteínas. Portanto, os vetores de expressão construídos não permitiram a obtenção de linhages de X. fastidiosa expressando elevados níveis dos fatores sigma.

4.1.2 Purificação das proteínas e produção de anticorpos para os fatores sigma alternativos de *Xylella fastidiosa*

Para produzir anticorpos policionais anti-RpoN, anti-RpoH e anti-RpoE, as ORFs completas dos genes *rpoN, rpoH* e *rpoE* de *X. fastidiosa* foram cionadas no vetor de expressão de *E. coli* pProEXHT e as proteínas heterólogas foram geradas em fusão com uma cauda de 6 histidinas. A cionagem dos três sigma alternativos de *X. fastidiosa* neste vetor foi feita nos sítios de restrição BamHI/EcoRI, adicionados nos oligonucleotídeos utilizados para amplificar os três genes por PCR.

A indução das proteínas de fusão foi feita pela adição de 0,5 mM de IPTG nas culturas líquidas de *E. coli* contendo as construções do pProEXHT com os sigmas clonados. Análise por gel de poliacrilamida-SDS do extrato de proteína de um clone positivo de cada sigma indica que para o σ^{N} (σ^{54}) (Figura 6A) e para o σ^{E} (σ^{24}) (Figura 6C) há um grande aumento da expressão das proteínas de 55 kDa e 27 kDa, respectivamente, com uma, duas e três horas após a adição de IPTG (canaletas 2, 3
e 4), em relação as mesmas culturas sem adição de IPTG (canaletas 1). Estas bandas coincidem com os tamanhos esperados para as proteínas de fusão, pois a clonagem das ORFs nos sítios de *BamHI/EcoRI* do vetor causa a adição de 27 aminoácidos na porção amino-terminal, resultando no acréscimo de aproximadamente 3 kDa no tamanho das proteínas His-RpoN e His-RpoE.



Figura 6: Indução e purificação das proteínas de fusão His-RpoN e His-RpoE de X. fastidiosa no sistema de expressão de E. coli pProEXHT. Um clone positivo de E. coli contendo as construções pProEXHTrpoN (6A), pProEXHTrpoE (6C) e pProEXHTrpoH (6E) foi cultivado em meio LB e alíquotas de extratos de proteína total das culturas sem IPTG (canaletas 1) e com uma, duas e três horas na presença de IPTG (canaletas 2, 3 e 4, respectivamente) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% desnaturante em sistema descontínuo de pH (SDS-PAGE). As setas indicam as proteínas induzidas. Passos de purificação das proteínas de fusão His-RpoN (6B) e His-RpoE (6D). As proteínas foram induzidas, as células foram lisadas por sonicação, o precipitado foi solubilizado com detergentes e as proteínas de fusão foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A numeração das canaletas é a mesma em 7B e 7D. Canaletas 1: sobrenadante do lisado de células; canaletas 2: precipitado do lisado de células; canaletas 3: sobrenadante dos precipitados tratados com detergentes; canaletas 4: pellet dos precipitados tratados com detergentes; canaletas 5: sobrenadantes da resina de níquel; canaletas 6 a 10: lavagens da resina; canaletas 11: eluição com imidazol. As setas indicam as proteínas de fusão His-RpoN (7B) e His-RpoE (7D) purificadas. P: padrão de peso molecular 10 kDa Protein Ladder (GibcoBRL). A banda mais intensa do marcador (50 kDa) está indicada.

Para o σ^{32} não foi observada a indução de uma proteína do tamanho esperado para a proteína de fusão His-RpoH (aproximadamente 36 kDa) após adição de 0,5 mM de IPTG por uma, duas e três horas, mesmo após a análise do extrato protéico de vários clones independentes. Entretanto, parece ter havido um aumento na expressão de proteínas entre 70 kDa e 90 kDa (Figura 6E). Mudanças em alguns parâmetros que influenciam a indução de proteínas neste sistema, como redução da temperatura de crescimento das culturas e uso de diferentes quantidades de IPTG, também foram realizadas, mas não resultaram na superexpressão do σ^{32} . Por não estar expressando a proteína de fusão, alguns clones pProEXHTrpoH foram sequenciados e confirmaram a clonagem correta do gene *rpoH* no vetor. A proteína σ^{32} de *X. fastidiosa* possui 54% de identidade com σ^{32} de *E. coli.* Assim, a falta de acúmulo do σ^{32} de *Xylella* pode ser resultante do efeito deletério desta proteína em grande quantidade dentro de E. coli, ou de sua rápida degradação por proteases específicas. As proteínas entre 70 kDa e 90 kDa que parecem estar sendo induzidas podem ser proteínas de choque térmico (HSPs) induzidas pelo rápido aumento do σ^{32} heterólogo.

Para purificação das proteínas de fusão His-RpoN (Figura 6B) e His-RpoE (Figura 6D), culturas de *E. coli* contendo as construções pProEXHT*rpoN* e pProEXHT*rpoE* foram induzidas com IPTG nas condições já estabelecidas e as células foram lisadas por sonicação para verificar a solubilidade das proteínas. Ambas as proteínas de fusão estavam praticamente ausentes na fração do sobrenadante (canaletas 1) e presentes em grande quantidade no precipitado, provavelmente em corpos de inclusão (canaletas 2). Assim, foi necessária a solubilização destas proteínas, antes da sua passagem pela resina de níquel. A fração precipitada das culturas lisadas foi tratada com deoxicolato 2% e sarkosil 0,3%. Após centrifugação, grande parte das proteínas foram detectadas na fração solúvel (canaletas 3), embora parte ainda tenha permanecido em corpos de inclusão, principalmente da proteína RpoN (canaletas 4).

Neste passo de solubilização das proteínas dos corpos de inclusão, houve uma purificação parcial das proteínas de fusão, com a eliminação de grande parte das proteínas celulares solúveis (canaletas 3). Para conseguir uma melhor purificação destas proteínas, esta fração solubilizada foi passada em resina de níquel para purificação por cromatografia de afinidade (canaletas 5 a 11). Parte das proteínas de fusão não se ligou a resina, sendo detectada no sobrenadante da resina (canaletas 5). Após quatro lavagens (canaletas 6 a 10) as proteínas de fusão foram eluídas com imidazol, resultando em uma boa quantidade das proteínas His-RpoN e His-RpoE parcialmente purificadas (canaletas 11).

Os anticorpos policionais contra as proteínas de fusão His-RpoN e His-RpoE purificadas foram obtidos pela imunização de coelhos com injeções subcutâneas e intravenosas destas proteínas em suspensão no adjuvante de Freund, como verificado por ensaio de *immunoblotting* utilizando extratos de J1a12 e as proteínas purificadas (dados não mostrados).

4.1.3 Construção de linhagens mutantes para os fatores sigma alternativos de *Xylella fastidiosa*

Um vetor para mutagênese por recombinação homóloga foi criado pela clonagem da origem de replicação do cromossomo (*oriC*) de *Xylella fastidiosa* no plasmídeo pUCBM21 (Figura 7). O fragmento de 400 pb amplificado por PCR e clonado no vetor pUCBM21 contem a região entre os genes *dnaA* e *dnaN* que apresenta elementos típicos de origens de replicação bacterianas e foi demonstrado ser capaz de funcionar como origem de replicação quando clonada em vetores para *Xylella fastidiosa* (Monteiro *et al.*, 2001b).

As construções para recombinação homóloga direta foram feitas com a clonagem da região interna dos três fatores sigma alternativos neste vetor (650 pb do gene *rpoN*, 490 pb do gene *rpoH* e 450 pb do gene *rpoE*). Um esquema simplificado da metodologia de mutagênese por recombinação homóloga direta utilizada para obtenção dos mutantes está apresentado na Figura 7. Como pode ser observado no esquema, esta estratégia depende de um único evento de recombinação, através do qual a construção inteira é inserida no gene alvo gerando duas cópias parcialmente truncadas nas extremidades (esta estratégia tem sido chamada de IDM – mutagênese por inserção e duplicação). Por depender de um único evento de recombinação a IDM tem sido utilizada com sucesso para geração de mutantes em bactérias nas quais as técnicas tradicionais de mutagênese por troca alélica não são facilmente aplicáveis, como nas bactérias *Lactobacillus sake* (Leloup *et al.*, 1997), *Streptococcus pneumoniae* (Lee *et al.*, 1998) e *Neisseria gonorrhoeae* (Hamilton *et al.*, 2001).



Figura 7: Metodologia utilizada para geração de mutantes para os fatores sigma de *Xylella fastidiosa.* Esquema de integração dos vetores para mutagênese por recombinação homóloga direta nos fatores sigma. O vetor pUCBM21oriC contendo o gene de resistência a ampicilina (Amp^r) como marca de seleção e os fragmentos internos dos três fatores sigma alternativos de *X. fastidiosa* (sigmas5 Δ 3 Δ) pode integrar por recombinação homóloga (representada pelo X) nos lócus cromossomais dos sigmas correspondentes, resultando em duas cópias parcialmente deletadas dos sigmas (sigmas3 Δ e sigmas 5 Δ), separadas pelo vetor pUCBM21*oriC*.

Doze colônias de *Xylella fastidiosa* J1a12 resultantes da transformação com os vetores pUCBM21*oriCrpoN650*, pUCBM21*oriCrpoH*490 e pUCBM21*oriCrpoE*450 (quatro colônias de cada) foram semeadas em placas e a seguir foram passadas para PWG líquido. Várias passagens sucessivas a cada 7 dias foram feitas para que ocorresse integração das construções nos genes dos fatores sigma e são necessárias porque o pUCBM21*oriC* é um vetor replicativo. A utilização de vetores replicativos em mutagênese dirigida é uma alternativa para bactérias nas quais construções baseadas em vetores suicidas não geram nenhum transformante, como linhagens CVC de *Xylella fastidiosa* (Da Silva Neto *et al.,* 2002; Gaurivaud *et al.,* 1996) e bactérias que não possuem o gene *recA*, como *Spiroplasma citri* (Duret *et al.,* 1999). Acredita-se que a utilização de vetores replicativos facilite a detecção de eventos raros de recombinação.

Da análise dos transformantes para detectar o evento de integração até a obtenção dos mutantes foram realizados vários procedimentos. Inicialmente foi feita verificação por PCR diretamente das culturas. As culturas que apresentaram a banda correta no PCR foram então plaqueadas, para se obter colônias isoladas, e estas foram novamente analisadas por PCR. A seguir, os clones foram analisados

por *Southern blotting* utilizando como sonda a região codificadora do gene alvo, para identificar o clone onde o gene foi corretamente interrompido pela inserção do vetor, e por *immunoblotting* para demonstrar que a inserção do vetor nos genes aboliu totalmente a produção das proteínas correspondentes. Na Figura 8 são apresentados os esquemas com os oligonucleotídeos utilizados para detectar a integração das construções por PCR. Estes pares de oligonucleotídeos amplificam as bandas esperadas somente se tiver ocorrido integração nos genes alvo, pois hibridizam com uma região no genoma fora do inserto clonado e outra no vetor (Figura 8A).

Os PCRs apresentados na Figura 8B foram feitos a partir de 12 culturas transformantes (quatro culturas de cada sigma), na segunda, quinta, décima primeira e décima oitava passagens (as bandas indicadoras de integração estão circuladas, as demais são inespecíficas). Para o gene *rpoE* foi detectada a banda indicadora de integração na quinta passagem em duas culturas e nas quatro culturas na 11ª passagem. Para *rpoN* a detecção da banda de integração só ocorreu em uma cultura na 18ª passagem. Para o gene *rpoH* não foi detectada integração ao longo destas dezoito passagens (as culturas foram analisadas ainda até a 27ª passagem, sem indício de integração no gene *rpoH*). Nas culturas em que não detectamos integração nos sigma correspondentes, provavelmente os vetores integraram na outra região de homologia com o cromossomo, a *oriC*, embora isto não tenha sido analisado. Os trabalhos utilizando vetores *oriC* para mutagênese por recombinação homóloga têm demonstrado que a integração realmente ocorre nos dois locais, embora ocorra preferencialmente na região que contém uma maior seqüência de homologia com o cromossomo (Gaurivaud *et al.,* 2002; Lartigue *et al.,* 2002).

As culturas transformantes para as quais foi detectada integração do vetor nos sigma correspondentes por PCR (para o gene *rpoN*, na décima oitava passagem e para o gene *rpoE*, na quinta passagem) foram espalhadas em placas para isolamento de colônias. Estas colônias isoladas foram utilizadas para confirmação de linhagens mutantes para cada um dos dois fatores sigma.

A Figura 9 apresenta a confirmação de linhagens mutantes para σ^{N} . Oito colônias isoladas a partir da cultura com indício de integração na décima oitava passagem foram analisadas por PCR e todas confirmaram a banda indicadora de integração (Figura 9A).





Figura 8: Detecção da integração das construções pUCBM21 oriCrpoN650, pUCBM21*oriCrpoH*490 e pUCBM21*oriCrpoE*450 nos fatores sigma alternativos de X. fastidiosa por PCR. (A). Esquemas das regiões do cromossomo de J1a12 após integração das construções nos genes rpoN, rpoH e rpoE. As posições dos pares de oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR (setas) e os tamanhos das bandas esperadas estão indicados na figura. Como o PCR combina um iniciador presente nas construções (Rev) e outro presente no cromossomo (Sigma54-1, Sigma32-1 ou Sigma24-1) as bandas esperadas só são amplificadas se ocorrer a integração no gene específico. (B). Reações de PCR de culturas transformantes de J1a12 após várias passagens. As bandas indicativas de integração estão circuladas de vermelho (as demais são bandas inespecíficas). Para o gene rpoE ocorreu integração na guinta passagem em duas culturas e nas guatro culturas na 11ª passagem. Para rpoN ocorreu integração em uma cultura na 18ª passagem. Para o gene rpoH não foi detectada integração. Os números indicam quatro culturas líquidas transformantes para cada gene. P: padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (GibcoBRL).

A correta integração da construção pUCBM21 oriCrpoN650 dentro da região codificadora do gene rpoN, no cromossomo de Xylella, foi confirmada por Southern *blotting* (Figura 9B). A sonda do gene *rpoN* reconheceu o fragmento EcoRI de 8,7 kb na linhagem selvagem J1a12 e os fragmentos EcoRI de 9,6 kb e 2,5 kb nas colônias isoladas. Estas duas bandas (9,6 kb e 2,5 kb) são resultado da presença de um sítio EcoRI na construção integrada e confirmam que o vetor está inserido corretamente dentro do gene rpoN, gerando mutante por inserção para este gene. Culturas transformantes na quinta passagem (5P) e na décima oitava passagem antes da obtenção de colônias isoladas (M) apresentaram padrão de banda igual a linhagem selvagem J1a12, indicando que a integração detectada pelo PCR era verdadeira, mas restrita a uma porcentagem das células da mistura. Para confirmar que as três colônias isoladas com a correta inserção do vetor dentro do gene rpoN eram mutantes nulos para a proteína σ^{N} , foram realizados experimentos de immunoblotting utilizando o soro policional anti-RpoN de X. fastidiosa. O soro reconheceu σ^N na linhagem selvagem J1a12 e na mistura (banda de aproximadamente 60 kDa) mas não detectou nada nas linhagens mutantes, indicando que a inserção do vetor no gene rpoN abole totalmente a produção da proteína σ^{N} (Figura 9C).

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para confirmação de linhagens mutantes para σ^{E} (Figura 10). Cultura com indício de integração, na quinta passagem, foi espalhada em placa e 16 colônias isoladas foram testadas por PCR, a maioria dando a banda esperada (Figura 10A). DNA genômico de quatro destas colônias e da linhagem selvagem J1a12 foi utilizado em experimento de *Southern blotting*, usando como sonda o gene *rpoE*. O padrão de bandas observado (5 kb para J1a12 e 6,8 kb e 1.35 kb para colônias isoladas) é indicativo de integração do vetor dentro do gene *rpoE* (Figura 10B). Anticorpo policional anti-RpoE de *Xylella* reconheceu σ^{E} em extrato total de células de *Xylella* J1a12 e a banda não foi detectada nas colônias mutantes, indicando que a integração do vetor dentro do gene *rpoE* resulta na ausência total da proteína correspondente e que as colônias isoladas são mutantes nulos para σ^{E} de *Xylella fastidiosa* (Figura 10C).



Figura 9: Confirmação de linhagem mutante *rpoN.* (A). Cultura com indício de integração (M, mistura de células) foi espalhada em placa e oito colônias isoladas foram testadas por PCR, todas dando a banda esperada de 1050 pb, indicativa de integração (seta). Na linhagem selvagem J1a12 (J) esta banda não é amplificada. (B). DNA genômico de três destas colônias isoladas e da linhagem J1a12 foi utilizado em experimento de *Southern blotting*, usando como sonda o gene *rpoN*, resultando em padrão de bandas indicativo de integração do vetor dentro do gene *rpoN*. (C). Anticorpo policional anti-RpoN produzido em coelho reconheceu σ^{N} em extrato total de células de *Xylella* J1a12 e a banda não foi detectada nas colônias mutantes (seta), indicando que a integração do vetor dentro do gene *rpoN* resulta na ausência da proteína correspondente. Transformantes na quinta passagem (5P) e na mistura de células não são mutantes *rpoN*. P: padrão de peso molecular 10 kDa *Protein Ladder* e 1 Kb Plus *DNA Ladder* (GibcoBRL).



Figura 10: Obtenção e complementação de linhagem mutante *rpoE.* (A). Cultura com indício de integração (M, mistura de células) foi espalhada em placa e 16 colônias isoladas foram testadas por PCR, a maioria dando a banda esperada, indicativa de integração (seta). (B). DNA genômico de quatro destas colônias e da linhagem selvagem J1a12 (J) foi utilizado em experimento de *Southern blotting*, usando como sonda o gene *rpoE*, resultando em padrão de bandas indicativo de integração do vetor dentro do gene *rpoE*. (C). Anticorpo policional anti-RpoE produzido em coelho reconheceu σ^{E} em extrato total de *Xylella* J1a12 e a banda não foi detectada nas colônias mutantes isoladas (seta), indicando que a integração do vetor dentro do gene *rpoE* resulta na ausência da proteína correspondente. (D). Complementação da linhagem mutante *rpoE*. Cópia em *trans* do gene *rpoE* introduzida no mutante *rpoE* restaura os níveis da proteína σ^{E} , gerando a linhagem complementada *rpoE*⁺. P: padrão de peso molecular 10 kDa *Protein Ladder* e 1 Kb Plus *DNA Ladder* (GibcoBRL).

Para complementar a linhagem mutante *rpoE*, uma cópia do gene *rpoE* completo, incluindo a provável região promotora, foi clonada no vetor pUCoriC, juntamente com um cassete de resistência a canamicina, e a construção resultante pUCoriC(*rpoE*)Can foi eletroporada na linhagem mutante. Colônias transformantes resistentes a canamicina foram obtidas e para verificar se a cópia em *trans* do gene *rpoE* produz a proteína σ^E na linhagem mutante transformada foram feitos experimentos de *immunoblotting*. A cópia em *trans* do gene *rpoE* foi capaz de elevar a quantidade da proteína σ^E no mutante para níveis semelhantes aos níveis da linhagem selvagem (Figura 10D), confirmando o sucesso da construção na complementação da linhagem mutante, gerando a linhagem complementada *rpoE*⁺.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MUTANTE *rpoE* E DEFINIÇÃO DO REGULON σ^{E} DE *Xylella fastidiosa*

4.2.1 Papel do fator σ^{E} de *Xylella fastidiosa* na resposta a estresses

Para verificar se o fator σ^{E} é importante para o crescimento de *Xylella* fastidiosa na presença de certos estresses, como relatado para E. coli (Hiratsu et al., 1995), a linhagem selvagem J1a12 e a linhagem mutante *rpoE* foram cultivadas em meio PWG na presença de etanol. Como mostrado na Figura 11, a mutação no gene rpoE não afeta o crescimento de Xylella em condições normais, sem a presença de estresses. No entanto, o gene rpoE é necessário para o crescimento de Xylella na presença de etanol, pois a linhagem mutante teve uma redução drástica na taxa de crescimento comparada a linhagem J1a12 na presença de 1,5% de etanol (Figura 11A). Para demonstrar o papel de σ^{E} na resposta ao choque térmico foram feitos ensaios de sobrevivência a 45 °C por vários períodos de tempo. Através destes ensaios foi demonstrado que a linhagem mutante rpoE é mais sensível a choque térmico e este fenótipo é revertido ao fenótipo da linhagem selvagem quando o mutante é complementado com uma cópia em trans do gene rpoE (Figura 11B). O fator σ^{E} não se mostrou importante para resposta a estresse osmótico e estresse oxidativo, pois a linhagem mutante rpoE apresentou a mesma sensibilidade que a linhagem J1a12 a estes dois estresses, como determinado por curvas de crescimento (presença de NaCl 0,5%) e ensaios de zona de inibição de crescemento (H₂O₂ 3%) (dados não mostrados). Portanto, σ^{E} mostrou-se importante para resposta aos estresses por choque térmico e etanol, duas condições que provocam o acúmulo de proteínas desdobradas na célula, provavelmente através da regulação de genes essenciais para sobrevivência sob tais condições, como proteases e *chaperones*.



Figura 11: Análise do mutante *rpoE* em resposta a etanol e choque térmico. (A). Curva de crescimento da linhagem J1a12 e do mutante *rpoE* na ausência ou na presença de etanol 1,5% em meio PWG. A figura mostra um experimento representativo de três repetições independentes. (B). Sobrevivência de *X. fastidiosa* J1a12 (linhagem selvagem), *rpoE* (mutante *rpoE*) e *rpoE*+ (mutante *rpoE* complementado) submetidas a choque térmico. As três linhagens foram cultivadas até fase logarítmica e alíquotas foram retiradas e plaqueadas em diferentes diluições para contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs). Os resultados são expressos como porcentagem de UFC em relação ao tempo zero (antes da exposição ao estresse). Nos tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos as culturas foram incubadas em banho-maria a 45 °C. Cada experimento, plaqueado em triplicata, foi repetido três vezes com culturas independentes. Os valores mostrados representativo.

4.2.2 Identificação de membros do regulon σ^{E} de *Xylella fastidiosa*

A estratégia utilizada para identificação de membros do regulon σ^{E} de *Xylella fastidiosa* consistiu em identificar, por microarranjo de DNA, transcritos específicos que têm sua expressão alterada quando compara-se a linhagem mutante *rpoE* com a linhagem selvagem. Além disso, foi realizada a validação de alguns genes por RT-PCR quantitativo e o mapeamento do início de transcrição de alguns destes genes, para identificação de um consenso para σ^{E} .

Inicialmente, foi feita a comparação do perfil transcricional total da linhagem J1a12 em relação à linhagem mutante *rpoE*, em condição sem estresse, usando RNA das duas linhagens cultivadas a 25 °C. A Tabela 7 apresenta os genes que tiveram expressão reduzida mais do que duas vezes no mutante *rpoE* e portanto, devem ser regulados positivamente por este fator sigma. Apenas três genes (XF2240, XF2241 e XF2594) apresentaram redução na expressão no mutante comparado à linhagem selvagem. Estes resultados sugerem que a RNA polimerase associada a σ^{E} é capaz de transcrever alguns genes em baixos níveis na ausência de um estímulo particular, mas que a maioria do regulon não deve estar ativo nesta situação. Não foram observados genes com expressão aumentada no mutante *rpoE* em relação à linhagem selvagem e que, portanto, seriam regulados negativamente por este fator sigma.

ORF	Produto	Função	Redução da Expressão
XF2240	Proteína hipotética (anti-sigma)	Regulador negativo σ^{E}	2,5
XF2241	Protease periplasmática	Degradação proteína	3,3
XF2594	Proteína hipotética conservada (peptidase M48)	Degradação proteína, peptídeo	2,3

Tabela 7: Genes positivamente regulados pelo fator σ^{E} de *Xylella fastidiosa*.

Produto das ORFs como anotado no genoma da linhagem 9a5c. Domínios conservados indicados entre parênteses. Números indicam quantas vezes os genes são menos expressos no mutante *rpoE* em relação a linhagem selvagem J1a12. Os valores são resultantes da análise de três lâminas, feitas a partir de RNAs extraídos de três culturas independentes das linhagens J1a12 e *rpoE* cultivadas por 7 dias a 25 ℃.

Para identificar maior número de genes do regulon σ^{E} foi feita uma comparação do perfil transcricional total da linhagem J1a12 em relação à linhagem mutante *rpoE*, na condição de choque de calor a 40 °C por 25 minutos, já que σ^{E} é necessário para resposta e este estresse em *X. fastidiosa* (Figura 11B). A Tabela 8

apresenta os genes que tiveram expressão reduzida no mutante *rpoE* e portanto, devem ser regulados positivamente por este fator sigma. Comparação dos resultados desta tabela com um estudo que determinou o estimulon de choque de calor para a linhagem 9a5c de *X. fastidiosa* (Koide *et al.*, 2006), indica que pelo menos destes genes com grande diferença de expressão são induzidos por choque térmico. Isto demonstra que o experimento foi realizado em uma condição que induz o regulon σ^{E} , facilitando a detecção das diferenças entre a linhagem selvagem e o mutante *rpoE*. Ao todo, vinte e um genes foram identificados mostrando reduzida expressão no mutante em relação à linhagem selvagem, em dezessete possíveis unidades de transcrição distintas (Tabela 8), representando fortes candidatos a serem transcritos por σ^{E} de *X. fastidiosa*. Não foram observados genes com expressão aumentada no mutante *rpoE* em relação à linhagem selvagem.

Para tentar verificar em quais processos fisiológicos os genes da Tabela 8 estão envolvidos realizamos uma busca por domínios conservados para estas ORFs. Cinco genes apresentaram algum tipo de domínio que permite associá-las a funções de proteases ou chaperones: XF0167 e XF2594 apresentam domínios das famílias M23 (Pfam01551) e M48 (Pfam01435) de peptidases, respectivamente; XF2241 possui um domínio de protease (Pfam00089) no N-terminal e dois domínios PDZ (Pfam00595) no C-terminal e apresenta alta similaridade com os ortólogos mucD de P. aeruginosa e htrA (degP) de E. coli, ambos codificando proteases de periplasma reguladas por σ^{E} nestas bactérias; XF0644 e XF1212 possuem domínios para chaperones do tipo peptidil-prolil cis-trans isomerase. Dois genes estão envolvidos em funções regulatórias: XF2534 que codifica para uma proteína regulatória de um provável sistema de dois componentes e XF2240 que possui domínio N-terminal (Pfam03872) para proteínas anti-sigma. XF2240 é precedida e parece ser co-transcrita com XF2239 que codifica para σ^{E} . Este tipo de organização no genoma do sigma ECF seguido pelo anti-sigma é bastante conservada em diferentes bactérias e será discutida adiante. O gene XF1415 codifica para uma enzima envolvida na síntese de peptideoglicano e o gene XF2739 codifica para uma endonuclease de restrição do sistema de restrição-modificação tipo I. Para os genes restantes não foi possível atribuir nenhuma função com base em similaridade de següência, codificando para proteínas hipotéticas ou hipotéticas conservadas.

		Dredute	Função Dutativo 8	Redução da
Or	۱r	Produto		Expressão ^b
•	XF0166	Proteína hipotética conservada	Função desconhecida	3.1
	XF0167	Proteína hipotética conservada	Degradação proteína,	6 5*
		(peptidase M23)	peptídeo	0.5
	XF0513	Endolisina de fago	Degradação parede	59
			celular	0.0
♠	XF0643	Proteína hipotética	Função desconhecida	9.6
	XF0644	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Dobramento proteína	19 3*
		(PPlase FKBP)		10.0
	XF1212	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Dobramento proteína	33
		(PPIase ciclofilina)		
	XF1257	Oligoribonuclease (exonuclease)	exonuclease	2.2*
	XF1340	Proteína hipotética	Função desconhecida	2.1
	XF1415	UDP-N-acetilglicosamina	Síntese peptideoglicano	4.0*
		1-carboxiviniltransferase		
	XF1694	Proteína hipotética	Função desconhecida	3.1*
	XF1712	Proteína hipotética	Função desconhecida	4.8*
	XF2169	Proteína hipotética conservada	Função desconhecida	2.3
	XF2240	Proteína hipotética (anti-sigma)	Regulador negativo σ^{E}	37.0*
↓	XF2241	Protease periplasmática	Degradação proteína	28.8*
	XF2533	Proteína hipotética	Função desconhecida	3.5
Ļ	XF2534	Proteína regulatória, sistema	Transdução de sinal	2.6*
		de dois componentes		2.0
	XF2594	Proteína hipotética conservada	Degradação proteína,	15 5*
		(peptidase M48)	peptídeo	10.0
	XF2739	Sistema endonuclease tipo I	Metabolismo DNA,	10.0*
		restrição-modificação	restrição	10.0
	XFa0010	Proteína hipotética	Função desconhecida	3.6
	XFa0059	Proteína replicação plasmídeo	Replicação plasmídeo	2.2
	XFa0061	Proteína SSB	Ligação ao DNA	3.0

Tabela 8: Genes candidatos ao regulon σ^{E} de *Xylella fastidiosa*.

Produto das ORFs como anotado no genoma da linhagem 9a5c. Domínios conservados indicados entre parênteses.^a Função predita com base em similaridade de seqüência.^b Expressão relativa dos genes nas linhagens J1a12/*rpoE* incubadas a 40 °C por 25 min. Os valores são resultantes da análise de seis lâminas, feitas a partir de RNAs extraídos de três culturas independentes. Genes adjacentes que podem ser co-transcritos são indicados por seta. *Genes induzidos por choque térmico como determinado em Koide *et al.* (2006).

Assim, o regulon σ^{E} de *X. fastidiosa* que emerge desta análise, realizada na condição de choque de calor, é composto por vários fatores de dobramento ou degradação de proteínas desnaturadas (*chaperones* e proteases), por proteínas envolvidas em funções como metabolismo de DNA, síntese da parede, transdução de sinal e proteínas hipotéticas.

Foram escolhidos oito genes para validação dos dados do microarranjo de DNA, sendo três genes que não apresentaram diferença de expressão na análise por microarranjo de DNA (XF1514, XF0285 e XF2239) e cinco genes com expressão reduzida no mutante *rpoE* (XF2240, XF2241, XF0167, XF0644, XF2594, Tabela 8). Os dados da análise por microarranjo de DNA e por qRT-PCR mostraram alto grau de correlação (r=0.90), confirmando assim os dados da análise por microarranjo (Figura 12A). Para confirmar indução por choque térmico dependente de σ^{E} de alguns genes deste regulon em *X. fastidiosa,* foram feitos experimentos de qRT-PCR, utilizando RNAs extraídos das linhagens J1a12 selvagem, mutante *rpoE* e mutante *rpoE* complementado (*rpoE*⁺), cultivadas a temperatura normal e submetidas a choque de calor.

A Figura 12B apresenta os resultados para os seis genes analisados. Os genes XF2240, XF2241, XF0644 e XF2594 foram bastante induzidos por choque térmico na linhagem selvagem J1a12, não mostraram gualquer indução no mutante rpoE e recuperaram a indução a níveis semelhantes a linhagem selvagem na linhagem complementada rpoE⁺, confirmando que estes genes são induzidos por choque térmico de modo dependente de σ^{E} . O gene XF2239 não é induzido por choque térmico e mostra níveis semelhantes nas três linhagens. A detecção do transcrito XF2239 (gene rpoE) no mutante rpoE foi possível porque utilizamos oligonucleotídeos no início do gene para o gRT-PCR, antes da interrupção pelo vetor. O gene XF0285 mostra indução por choque térmico na linhagem J1a12, no mutante *rpoE* e na linhagem $rpoE^+$, indicando que a indução não é dependente de σ^{E} . Estes resultados confirmam a validação dos dados de microarranjo de DNA feita por gRT-PCR usando apenas as linhagens J1a12 e *rpoE* sob choque térmico (Figura 12A), demonstrando ainda que a diferença nos níveis dos transcritos entre essas duas linhagens foi realçada pelo fato dos genes serem induzidos por choque térmico. A restauração dos níveis de transcritos específicos na linhagem rpoE⁺ é uma comprovação adicional do envolvimento do fator σ^{E} na transcrição destes genes. Vários dos genes mostrados na Figura 12 fazem parte da própria via de regulação da atividade do fator σ^{E} e serão discutidos posteriormente.



Figura 12: Validação da expressão de genes do regulon σ^{E} em resposta a choque térmico. (A). Comparação dos níveis de expressão de oito genes como determinado por ensaios de microarranjo de DNA e qRT-PCR. Expressão dos genes foi medida por qRT-PCR com três amostras de RNA independentes das linhagens J1a12 e *rpoE* expostas a 40 °C por 25 minutos e os níveis foram correlacionados com os dados correspondentes da análise de microarranjo de DNA (Tabela 8). (B). Expressão de genes selecionados em diferentes linhagens. Expressão foi medida por RT-PCR quantitativo usando RNAs extraídos da linhagem sevagem (J1a12), do mutante (*rpoE*) e do mutante complementado (*rpoE*⁺), cultivados em condição normal e submetidos a choque de calor 40 °C, 25 minutos. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT utilizando o gene *dnaQ* como controle endógeno.

A determinação do início de transcrição de vários genes do regulon σ^{E} foi feita por ensaio de extensão de oligonucleotídeo, utilizando RNAs extraídos das linhagens J1a12, rpoE e rpoE⁺, cultivadas a temperatura normal e submetidas a choque de calor 40 ℃ por 25 minutos, com a finalidade de mapear as regiões promotoras e verificar a expressão dos genes nas diferentes linhagens (Figura 13A). As bandas correspondentes ao início de transcrição são induzidas por choque térmico na linhagem J1a12, não são detectadas no mutante rpoE e recuperam a indução por choque térmico na linhagem rpoE⁺, confirmando por outra metodologia que estes genes são induzidos por choque térmico de modo dependente de σ^{E} . Foi definido o início de transcrição de cinco genes do regulon σ^{E} utilizando esta metodologia: uma adenina localizada 73 bases do códon de início de tradução para o gene XF0644; uma adenina localizada 46 bases do códon de início de tradução para XF2594; uma timina localizada 190 bases do códon de início de tradução para XF2240; uma citosina localizada 104 bases do códon de início de tradução para o gene XF1694; e uma timina localizada 87 bases do códon de início de tradução para o gene XF0167 (Figura 13B).

Alinhamento da seqüência de nucleotídeos destes cinco promotores dependentes de σ^{E} mapeados experimentalmente por ensaio de extensão de oligonucleotídeo revelou um consenso ggAACnn 16/17 pb TccnA, que se assemelha aos consensos para as seqüências reconhecidas pelos ortólogos de σ^{E} de *P. aeruginosa* e *E. coli* (Figura 13B). Uma busca para esta seqüência foi realizada manualmente usando como parâmetros a seqüência AAC-16/17 nt-TnnnA em 300 nt a montante do ATG anotado dos genes identificados como regulados por σ^{E} nas análises de microarranjo de DNA. Estes elementos conservados do promotor foram identificados a montante de mais nove outros genes regulados por σ^{E} (Figura 13C). A detecção de um consenso para os promotores destes genes é uma forte indicação de que eles têm sua expressão afetada pela ligação direta de σ^{E} , direcionando a transcrição pela RNA polimerase e não por mecanismos indiretos.



Figura 13: Definição do sítio de ligação para σ^{E} . (A). Mapeamento do início de transcrição de genes com indução por choque térmico dependente de σ^{E} . RNA total das linhagens J1a12, rpoE e rpoE⁺ cultivadas a 25 °C (C) ou incubadas a 40 °C por 25 minutos (H) foram usados em ensaios de extensão de oligonucleotídeo. Os produtos de extensão foram analisados em gel de poliacrilamida junto com reações de següência de DNA do bacteriófago M13. Setas indicam início de transcrição. (B). Alinhamento da seqüência de nucleotídeos de promotores dependentes de σ^{E} mapeados experimentalmente. O início de transcrição e as seqüências -10 e -35 estão destacados. Um consenso proposto para o fator σ^{E} de Xylella fastidiosa está comparado aos consensos para σ^{E} de E. coli e AlgU de P. aeruginosa. (C). Alinhamento de possíveis seqüências promotoras de genes regulados por σ^{E} . Os inícios de transcrição mapeados para cinco genes do regulon estão sublinhados. Alinhamento das outras seqüências foi feito por busca manual do consenso em 300 pb a montante do ATG das ORFs indicadas. Nucleotídeos destacados em cinza estão de acordo com o consenso proposto para σ^{E} de *Xylella*. Os números indicam a posição da primeira adenina da seqüência conservada AAC em relação à adenina do códon de início de tradução.

4.2.3 Regulação do fator σ^{E} de Xylella fastidiosa

Xylella fastidiosa possui um único sigma ECF, ortólogo do fator σ^{E} . A ORF XF2239, que codifica para σ^{E} é imediatamente seguida pela ORF XF2240, que codifica para uma proteína com características de fator anti-sigma, apresentando um domínio N-terminal de interação com fator σ^{E} (Pfam03872), seguido por uma região transmembrana e é predita como proteína de membrana interna pelo programa PSORT (Gardy *et al.*, 2005). As duas ORFs apresentam inclusive sobreposição nos códons de parada e início de tradução, o que poderia indicar que as duas proteínas são traduzidas de maneira acoplada, com o fator sigma associando-se imediatamente ao anti-sigma, que o mantém inativo por seqüestrá-lo na membrana citoplasmática. A ORF XF2241 possui um domínio de protease (Pfam00089) no N-terminal e dois domínios PDZ (Pfam00595) no C-terminal e apresenta alta similaridade com ortólogos de proteases da família *htrA*.

Para verificar se o gene XF2239 é co-transcrito com XF2240 e se XF2240 é co-transcrito XF2241 foram feitos ensaios de RT-PCR com utilizando oligonucleotídeos que hibridizam no início e no final de cada par de genes, com RNAs da linhagem J1a12 cultivada a temperatura normal e em choque térmico. As reações de transcrição reversa amplificaram bandas do tamanho esperado com os dois pares de oligonucleotídeos, nas duas condições, e nenhuma amplificação ocorreu nos controles negativos (Figura 14A). Isto indica que o cluster XF2239, XF2240, XF2241 é co-transcrito a temperatura normal e em choque térmico, embora este experimento não permita inferir os níveis dos transcritos amplificados, pois é um RT-PCR não quantitativo.

A regulação transcricional destes três genes em resposta a choque de calor pode ser observada nos experimentos de microarranjo de DNA, qRT-PCR e ensaio de extensão de oligonucleotídeo, apresentados no item 4.2.2. Na presença de choque de calor XF2239 não é induzido, ocorrendo inclusive redução nos níveis do transcrito, enquanto XF2240 e XF2241 são bastante induzidos e esta indução é dependente de σ^{E} (Figura 12B). Um promotor dependente de σ^{E} localizado dentro do gene *rpoE* é responsável pela indução por choque térmico dos genes XF2240 e XF2241 (Figura 13), como uma unidade de transcrição única, já que não foi encontrado um promotor para XF2241 (foram feitas tentativas de mapear o início de transcrição por ensaio de extensão de oligonucleotídeo com dois oligonucleotídeos diferentes) e os dois genes são co-transcritos (Figura 14A).



Figura 14: Determinação da unidade de transcrição rpoE/XF2240/XF2241. (A). Verificação de co-transcrição do cluster rpoE (XF2239), XF2240, XF2241 por RT-PCR. Reações foram feitas com RNA da linhagem J1a12 cultivada a 25 °C (C+), incubada a 40 °C por 25 minutos (H) ou controle sem transcriptase reversa (C-). Amplificação foi feita com pares de oligonucleotídeos compreendendo os genes XF2239/XF2240 ou os genes XF2240/XF2241. A seta indica os produtos específicos amplificados. (B). Mapeamento do início de transcrição do gene rpoE por ensaio de extensão de oligonucleotídeo. RNA extraído linhagem J1a12, cultivada a 25 °C (C) ou submetida a choque de calor 40 °C, 25 minutos (H) foi hibridizado com oligonucleotídeo marcado com ³²P e o oligo foi estendido com transcriptase reversa. O produto de extensão foi analisado em gel de DNA junto com reações de següência de DNA da região promotora do gene rpoE. Seta indica banda correspondente a um fraco início de transcrição, não induzido por choque térmico. (C). Confirmação do início de transcrição do gene rpoE por ensaio de 5' RACE. Foi feita transcrição reversa a partir do RNA da linhagem J1a12 usando oligo SP1 e o cDNA resultante foi amplificando por PCR com oligos SP2 e ancorado usando kit 3'/5' RACE. Produto de PCR de 300 pb obtido foi clonado e següenciado. Eletroferograma mostra um dos clones següenciados. A primeira base (A) depois da cauda dT corresponde ao primeiro nucleotídeo transcrito. O início de transcrição, localizado 152 nt do códon de início de tradução, coincide com o início mapeado por ensaio de extensão de oligonucleotídeo.

O início de transcrição do gene *rpoE* foi determinado por ensaio de extensão de oligonucleotídeo (Figura 14B) e pelo ensaio de 5' RACE (Figura 14C). O mesmo início de transcrição, uma adenina localizada 152 nt do códon de início de tradução, foi encontrada com as duas metodologias. Uma seqüência com similaridade ao consenso para promotores σ^{70} de *E. coli* foi encontrada na região -35 (TTGACG), sugerindo que a expressão desta unidade de transcrição é dirigida pelo fator sigma vegetativo. Em condição de choque térmico a banda correspondente a este início de transcrição não foi observada (Figura 14B), confirmando a redução na expressão do gene rpoE observada por gRT-PCR (Figura 12B). Vários genes codificando para fatores sigma ECF apresentam dois inícios de transcrição: um promotor transcrito a partir do sigma vegetativo, responsável pela transcrição basal, e um promotor autoregulado responsável pela indução do gene em resposta a um estímulo específico. No caso do gene rpoE de Xylella este circuito de autoregulação parece não existir, pois não encontramos um promotor induzido por choque térmico, uma condição que comprovadamente aumenta a atividade de σ^{E} em *Xylella fastidiosa*. Portanto, em Xylella fastidiosa σ^{E} não é autoregulado, mas regula positivamente o anti-sigma em resposta a choque térmico, provavelmente como um mecanismo de desligamento da resposta.

Além do choque térmico, demonstramos que σ^{E} é importante para resposta a estresse por etanol (Figura 11). Assim, para verificar se o mesmo mecanismo de regulação estava ocorrendo na resposta ao estresse por etanol, foram feitos experimentos de qRT-PCR, com RNAs da linhagem J1a12 para os genes XF2239 (*rpoE*) e XF2240 (*rseA*). Como pode ser observado na Figura 15, o gene *rpoE* não foi induzido por etanol, enquanto o gene *rseA* apresentou indução nos tempos de 15 minutos e 30 minutos de exposição a 5% de etanol. Embora os níveis de indução sejam bem inferiores aos níveis observados em resposta ao choque térmico (Figura 12B), estes resultados indicam um mesmo padrão de regulação em resposta aos dois estresses, ou seja, não ocorre autoregulação do gene *rpoE*, mas sim aumento da transcrição do gene *rseA*, em resposta aos estresses.

Para verificar se o gene *rpoE* de *X. fastidiosa* é induzido em resposta a outros estresses foram feitos experimentos de qRT-PCR utilizando RNAs extraídos da linhagem selvagem J1a12, cultivada em condição normal e submetida a estresse osmótico, estresse oxidativo, choque de calor e choque frio, por 30 minutos e de células na fase estacionária. O tipo, a intensidade e a duração dos estresses foram

escolhidos com base em dados da literatura e todos eles provocam indução em nível transcricional de sigma ECFs em outras bactérias (Keith e Bender, 1999; Miticka *et al.*, 2003).



Figura 15: Regulação transcricional dos genes *rpoE* (XF2239) e *rseA* (XF2240) em **resposta a estresse por etanol.** RT-PCR quantitativo foi feito com RNAs extraídos da linhagem J1a12 cultivada em meio PWG, mantida na ausência ou na presença de 5% de etanol por 15 minutos e 30 minutos. RNAs foram tratados com DNAse e convertidos a cDNA. O PCR em tempo real foi feito com Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen), usando oligonucleotídeos específicos para cada gene. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método 2^{-ΔΔCT} utilizando o gene dnaQ como controle endógeno. Os dados mostrados são a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes.

Como pode ser observado na Figura 16A, para a maioria dos estresses testados os níveis de expressão do gene *rpoE* variaram muito pouco em relação a situação controle sem estresse, mostrando pequena indução. Na situação de choque de calor a 45 °C a expressão de *rpoE* caiu bastante, provavelmente como um efeito geral de redução da transcrição na célula, observada na resposta ao choque térmico. O estresse por choque de calor já havia sido testado na condição de 40 °C, dando resultado semelhante (Figura 12B). A repetição em uma temperatura maior foi feita pelo fato de σ^{E} ser um fator sigma de resposta a choque térmico extremo, para garantir que a indução não tinha sido observada por termos utilizado uma temperatura abaixo da necessária.

Abordagem semelhante foi feita para a proteína σ^{E} de *Xylella fastidiosa*, analisando se ocorre aumento na quantidade desta proteína por *immunoblotting* quantitativo. A Figura 16B mostra que não houve qualquer alteração na quantidade da proteína σ^{E} quando as culturas foram submetidas aos diferentes estresses, por até 120 minutos.



Figura 16: Regulação do fator σ^{E} em resposta a estresses. (A). Análise por RT-PCR quantitativo da expressão do gene *rpoE* em resposta a diferentes estresses. RNAs extraídos da linhagem selvagem J1a12, cultivada em condição normal e submetida aos estresses indicados na figura por 30 minutos, foram utilizados nos ensaios de qRT-PCR. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o gene *dnaQ* como controle endógeno, e são mostrados em relação a situação controle sem estresse. (B). Análise da expressão da proteína σ^{E} de *Xylella fastidiosa* por *immunoblotting* em resposta a diferentes estresses. A linhagem J1a12 foi cultivada até fase logarítmica e alíquotas foram coletadas antes (0) e em diferentes minutos (tempos indicados) após a adição dos estresses. As células foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão de amostra e fervidas. Quantidades iguais de amostra foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policional anti-RpoE.

Os dados acima sugerem que σ^{E} de *Xylella fastidiosa* não é induzido em níveis transcricional e traducional e que seu papel na resposta ao choque térmico é mediado provavelmente por aumento na atividade de σ^{E} pré-formado. Este mecanismo de ativação talvez possa ocorrer de modo semelhante à regulação do fator σ^{E} de *E. coli*, atrarvés da sua liberação do anti-sigma em resposta a presença de porinas desdobradas no periplasma (Ades, 2004).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MUTANTE *rpoN* E DEFINIÇÃO DO REGULON σ^{N} DE *Xylella fastidiosa*

4.3.1 Análise in silico de regulon σ^{N} de *Xylella fastidiosa*

Uma estratégia bastante utilizada para definição de regulons é a busca por seqüências consenso reconhecidas pela proteína regulatória de interesse, através de algoritmos computacionais. A definição do regulon σ^N através de métodos computacionais foi realizada para *E. coli* (Reitzer e Schneider, 2001), *Pseudomonas putida* (Cases *et al.*, 2003), *Salmonella typhimurium* (Studholme, 2002) e várias espécies de Rhizobiaceae (Dombrecht *et al.*, 2002). Nestes trabalhos foram utilizados programas que fazem a busca pelo consenso para σ^N nas seqüências dos genomas com base numa matriz de freqüência criada a partir da compilação de 186 sítios de ligação de σ^N em diferentes bactérias (Barrios *et al.*, 1999).

Para encontrar sítios de ligação de σ^{N} em *X. fastidiosa*, uma análise *in silico* semelhante foi realizada. Regiões de 400 nucleotídeos a montante do códon de início de tradução de todas as ORFs do genoma de X. fastidiosa 9a5c, foram analisadas com o módulo PATSER do Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) [http://rsat.ulb.ac.be/rsat/] para presença da seqüência consenso -24/-12 do promotor σ^{54} . O programa foi carregado com a matriz de peso mostrada na Tabela 5, derivada de 186 promotores dependentes de σ^N caracterizados em diferentes bactérias (Barrios et al., 1999). O programa fornece scores de 0 a 16 aos sítios preditos. Uma análise semelhante feita em genomas de 6 bactérias da ordem Rhizobiales utilizou como corte scores de 8.9, baseado em uma análise prévia com promotores dependentes de σ^{N} para 67 matriz definidos а mesma experimentalmente (Dombrecht et al., 2002). Assim, analisamos com mais detalhes apenas os sítios preditos com score acima de 8.9.

O programa encontrou 121 potenciais sítios de ligação de σ^N a montante de genes na orientação correta e 92 potenciais sítios de ligação de σ^N a montante de genes na orientação oposta, com *scores* acima de 8.9, no intervalo de 400 pb a montante de todas as ORFs do genoma de *X. fastidiosa.* No conjunto dos 121 potenciais sítios de ligação de σ^N orientados corretamente, foram eliminados todos os sítios localizados dentro de genes, resultando em 23 sítios localizados em regiões intergênicas, mostrados na Tabela 9. Geralmente, neste tipo de análise, sítios localizados dentro de genes são eliminados (Reitzer e Schneider, 2001; Dombrecht *et al.*, 2002; Cases *et al.*, 2003), pois promotores dependentes de σ^N foram sempre mapeados em regiões intergênicas.

A Tabela 9 apresenta os 23 genes associados aos melhores *scores* para potenciais promotores dependentes de σ^{N} . Destes, 10 genes codificam proteínas hipotéticas ou hipotéticas conservadas, às quais não é possível atribuir função com base em similaridade de seqüência. Os demais genes codificam para proteínas com diversas funções celulares, como: motilidade (XF2542), regulação transcricional (XF1354 e XF1943), transporte (XF0010 e XF1749) e metabolismo do carbono (XF1554, XF1121, XF0305 e XF0290). Uma ausência relevante nesta tabela são genes de metabolismo de nitrogênio, sobretudo considerando que *Xylella fastidiosa* possui um ativador de σ^{N} (XF1848) que provavelmente é ortólogo de NtrC, o ativador de σ^{N} dos genes de resposta a carência de nitrogênio em *E. coli* (o caso do gene da glutamina sintetase será discutido abaixo).

O grupo de David J. Studholme desenvolveu o programa *PromScan* para pesquisar consensos de σ^N em genomas bacterianos seqüenciados e tem disponibilizado tabelas com possíveis promotores dependentes de σ^N para muitos genomas, dentre eles o genoma de *X. fastidiosa* 9a5c (http://www.promscan.uklinux. net). Comparando nossa análise *in silico* com a análise feita com o programa PromScan verificamos que 13 dos nossos 23 potenciais promotores dependentes de σ^N também foram identificados pelo *PromScan*, sobretudo aqueles com melhores *scores*, fornecendo desta forma, maior confiabilidade para estes sítios (Tabela 9).

Embora os algoritmos computacionais detectem corretamente muitos dos promotores, este tipo de análise tem suas limitações, como a inclusão de falsos positivos ou a exclusão de promotores que se afastam do consenso ou ainda ORFs anotadas incorretamente. Um exemplo deste último problema é o gene da glutamina

sintetase (XF1842). Em nossa análise global não foi detectado um potencial sítio de ligação de σ^N para este gene, a despeito dele ser membro do regulon σ^N em inúmeras bactérias. Em uma análise mais detalhada verificamos que esta ORF foi anotada incorretamente e a seqüência codificadora deve ser 108 pb menor do que o indicado. Rodando o programa nesta nova região encontramos um sítio de ligação de σ^N com *score* 10.52, totalizando os 24 genes mostrados na Tabela 9.

Gene ^a	Score	Produto
XF2542	12.38	Proteína estrutural da fímbria do tipo IV PilA
XF1354	11.58	Regulador transcricional da família MarR
XF0158	11.32	Proteína hipotética
XF0623	10.62	Proteína hipotética
XF1842 ^b	10.52	Glutamina sintetase
XF0220	10.46	Prolina dipeptidase
XF0178	10.39	Proteína hipotética
XF0414	10.29	Proteína hipotética
XF1850	10.26	Possível transposase
XF1471	10.22	Proteína hipotética
XF1554	10.22	Fumarato hidratase
XF1315	10.10	Proteína hipotética
XF0746	9.93	Proteína hipotética
XF1121	9.42	Metilenotetrahidrofolato redutase (NADPH)
XF0010	9.36	Proteína de transporte ExbB
XF0507	9.29	Proteína hipotética
XF1784	9.26	Proteína hipotética
XF1943	9.20	Proteína semelhante à histona
XF1453	9.17	Possível ATPase
XF0305	9.14	NADH-ubiquinona oxidoredutase
XF1168	9.02	Proteína ribossomal 50S
XF1249	8.97	Proteína hipotética
XF1749	8.92	Transportador da família MFS
XF0290	8.90	Aconitato hidratase

Tabela 9: Genes associados aos promotores preditos para σ^{N} com melhor *score* no genoma completo da linhagem 9a5c de *Xylella fastidiosa*.

^aGenes destacados em negrito apresentam potenciais promotores dependentes de σ^N também detectados na análise realizada pelo programa PromScan (http://www.promscan. uklinux.net). ^b Sítio de ligação de σ^N detectado na região a montante da ORF XF1842 reanotada.

Uma característica fundamental dos promotores dependentes de σ^N é a necessidade estrita de proteínas ativadoras (EBPs) para a formação do complexo aberto de transcrição. Assim, a identificação destes ativadores é um passo importante na análise do regulon σ^N . Uma busca no banco de dados Pfam por

proteínas com o domínio pfam00158 (domínio central de interação ao σ^N , comum a todos os EBPs) e uma pesquisa com o programa BLASTP (Zhang e Madden, 1997), usando como sonda o domínio central de NtrC de *E. coli* (aminoácidos 140 a 369) permitiu identificar apenas dois EBPs no genoma de *Xylella fastidiosa* (Figura 17A). Análises similares feitas em outros genomas demonstra que o número de EBPs varia bastante entre as bactérias, algumas tendo alto número de EBPs (53 em *Myxococcus xanthus,* 22 em *Pseudomonas putida,* 13 em *E. coli*), enquanto outras têm poucos (2 em *Treponema pallidum,* 4 em *Caulobacter crescentus*) (http://www.promscan.uklinux.net).

As duas EBPs de *Xylella* (XF1848 e XF2545) apresentam uma organização estrutural típica de proteínas desta família (Studholme e Dixon, 2003), com um domínio C-terminal contendo o motivo HTH (pfam02954), um domínio central de hidrólise de ATP (pfam00158) e um domínio regulador de resposta do tipo CheY no N-terminal (pfam00072) (Figura 17A). No domínio central das EBPs existe um motivo quase invariável (motivo GAFTGA) que foi encontrado nas duas EBPs de *X. fastidiosa*, embora XF2545 apresente uma pequena modificação no motivo para GSFTGA. Análise do contexto genômico destes ativadores demonstra que eles são precedidos e provavelmente co-transcritos com genes que codificam para proteínas sensoras do tipo histidina quinases (Figura 17B), podendo funcionar como um sistema de dois componentes. Outra evidência de que as duas EBPs de *Xylella* devem ser reguladores de resposta de sistemas de dois componentes é a presença do resíduo conservado de aspartato comumente localizado na posição 54 do domínio N-terminal, que é fosforilado pela histidina quinase sensora.

Outra propriedade interessante dos genes codificando EBPs é sua tendência de se localizar próximo a seus promotores alvo (Studholme, 2002; Cases *et al.*, 2003). Análise da região genômica próxima a XF1848 indicou a presença dos genes da glutamina sintetase (XF1842), de uma proteína regulatória de nitrogênio P-II (XF1843) e de um transportador de amônia (XF1844), todos genes conhecidos como parte do regulon σ^{N} em *E. coli*, envolvidos no metabolismo de nitrogênio. O fato de XF1848 e XF1849 apresentarem maior similaridade com o sistema NtrB/NtrC de *E. coli* (Figura 17B) e estarem próximos de genes importantes para metabolismo de nitrogênio pode ser uma indicação de que a carência a nitrogênio é uma das respostas fisiológicas às quais o regulon σ^{N} de *X. fastidiosa* responde.



Figura 17: Análise dos ativadores dependentes de σ^N no genoma de *Xylella fastidiosa.* (A). As duas proteínas do tipo EBPs encontradas no genoma de *Xylella* estão representadas com domínios do Pfam com os respectivos números de acesso. Os domínios estão descritos no texto. (B). Análise do contexto genômico das duas EPBs indica provável co-transcrição com proteínas sensoras do tipo histidina quinases. As similaridades com os sistemas de dois componentes NtrC/NtrB de *E. coli*, para XF1848, e PiIR/PiIS de *Pseudomonas aeruginosa*, para XF2545, estão indicadas.

O mesmo tipo de análise feito para a EBP XF2545 indicou que ela apresenta maior similaridade com o sistema PilR/PilS de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 17B) e está próxima no genoma a genes relacionados a biogênese da fímbria do tipo

IV (XF2537, XF2538, XF2539, XF2542 e XF2544). Em *Pseudomonas aeruginosa* pelo menos 40 genes foram identificados como importantes para montagem, função e regulação da fímbria do tipo IV (Mattick *et al.*, 1996).

4.3.2 Papel de σ^{N} na regulação de genes que codificam estruturas fimbriais

Para determinar o regulon σ^{N} de *X. fastidiosa* foi realizada comparação do perfil transcricional global da linhagem J1a12 em relação à linhagem mutante *rpoN* por microarranjo de DNA, utilizando RNA das duas linhagens cultivadas em meio complexo PWG. Nesta análise foram identificados 38 genes diferencialmente expressos, sendo que 7 genes tiveram expressão reduzida (positivamente regulados por σ^{N}) e 31 genes tiveram expressão aumentada (negativamente regulados por σ^{N}) no mutante *rpoN* em relação à linhagem selvagem. Entretanto, a maioria destes genes apresentou pequena variação de expressão, pois somente 9 deles mostraram mais de duas vezes de variação de expressão, sendo dois genes positivamente regulados por σ^{N} (XF2545 e XF1693) e sete genes negativamente regulados por σ^{N} (Tabela 10, genes indicados em negrito).

	Gene	Produto ^a	<i>rpoN</i> /WT⁵	
Ge	aenes positivamente regulados por RpoN			
	XF0039	Canal mecano-sensível de larga-condutância	0.57	
	XF1390	Citocromo O ubiquinol oxidase	0.58	
4	XF1693	proteína hipotética	0.47	
	XF1694	proteína hipotética	0.53	
I	XF2542	Proteína da fímbria tipo IV	0.02	
	XF2548	Succinil-CoA sintetase, subunidade alfa	0.64	
	XFa0008	Proteína transferência conjugativa	0.60	
Ge	enes negativ	amente regulados por RpoN		
	XF0074	proteína hipotética	2.22	
	XF0080	precursor adesina fímbria	1.64	
	XF0081	precursor usher membrana externa	1.75	
	XF0082	precursor chaperone	2.01	
	XF0083	precursor subunidade fímbria	2.14	
4	XF0087	permease alfa-cetoglutarato	1.64	
	XF0088	proteína ligadora GTP	1.81	

Tabela 10: Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante *rpoN* comparada a linhagem selvagem J1a12.

▲ XF0093	proteína divisão celular	1.74
XF0094	proteína divisão celular	1.70
↓ XF0108	proteína processamento 16S rRNA	1.71
XF0109	tRNA (guanina-N1-)-metiltransferase	1.73
'XF0111	metionina aminopeptidase	1.94
XF0116	succinil-diaminopimelato desuccinylase	1.68
XF0119	proteína hipotética	2.20
XF0144	descarboxilase biossíntese arginina	1.76
XF0150	dUTPase	1.94
▲ XF0164	Exodeoxiribonuclease	2.06
XF0165	proteína transdução sinal beta-lactamase	1.99
XF0166	proteína hipotética conservada	1.79
XF0489	proteína hipotética	1.87
▲ XF0490	proteína hipotética	1.87
XF0491	proteína hipotética	1.88
XF0492	proteína hipotética	1.98
XF0493	proteína hipotética	1.59
XF0511	proteína hipotética	1.81
XF1172	preproteína translocase subunidade SecY	1.52
XF1655	proteína hipotética	1.73
XF1948	proteína produção colicina V	1.55
XF2336	proteína regulatória, sistema dois componentes	2.14
XF2484	proteína fago	2.08
XF2499	proteína hipotética	1.87

Produto das ORFs como anotado no genoma da linhagem 9a5c. ^a Função predita com base em similaridade de seqüência. ^b Expressão relativa dos genes nas linhagens *rpoN*/J1a12 cultivadas em PWG. Os valores são resultantes da análise de três lâminas, feitas a partir de RNAs extraídos de três culturas independentes. Genes adjacentes que podem ser co-transcritos são indicados por seta. Genes indicados em negrito apresentaram diferença de expressão de mais de duas vezes.

Os 7 genes que tiveram expressão reduzida no mutante *rpoN* em relação à linhagem selvagem codificam proteínas envolvidas em metabolismo energético (XF1390 e XF2548), transporte (XF0039), sistema de secreção do tipo IV (XFa0008), biogênese da fímbria tipo IV (XF2542) e proteínas de função desconhecida (XF1693-XF1694). Dentre eles, apenas o gene XF2542 é forte candidato a ser diretamente regulado por σ^N , pois mostrou ser mais de 40 vezes menos expresso no mutante em relação à linhagem selvagem (Tabela 10) e possui um sítio de ligação para σ^N (Tabela 9). Os outros seis genes apresentam pequena variação de expressão e não possuem consenso para σ^N . O produto da ORF XF2542 apresenta 35% de identidade (45% de similaridade) à pilina de *P*.

aeruginosa, codificada pelo gene *pilA*. Este gene codifica a subunidade estrutural da fímbria tipo IV e é transcrito a partir de promotores dependentes de σ^{N} em várias bactérias (Ishimoto e Lory, 1989; Wu e Kaiser, 1997; Parker *et al.*, 2006).

Todos os 31 genes que tiveram expressão aumentada no mutante *rpoN* em relação à linhagem selvagem mostraram pequena variação de expressão (1,5 a 2,2 vezes) e muitos deles aparecem agrupados em regiões do genoma, alguns formando, provavelmente, longos operons: XF0080-81-82-83 organizado em um provável operon de biossíntese da fímbria tipo I; XF0093-94 organizado em um operon que codifica proteínas de divisão celular; XF0108-09 organizado em um operon de proteínas de processamento de rRNA; e XF0489-90-91-92-93, organizado em um operon que codifica pequenas proteínas hipotéticas (Tabela 10).

Um dado interessante desta análise de microarranjo de DNA é que σ^{N} regula positivamente a transcrição do gene *pilA* (XF2542), um gene importante para biogênese da fímbria tipo IV, e regula negativamente a transcrição do operon que codifica proteínas envolvidas na biogênese da fímbria tipo I (XF0080-81-82-83). Como estas duas classes de fímbrias estão envolvidas em importantes processos, como formação de biofilme e *twitching motility* em *X. fastidiosa* (Meng *et al.* 2005; Li *et al.* 2007), os genes *pilA* (XF2542) e *fimA* (XF0083) foram utilizados para validar os dados de microarranjo de DNA por RT-PCR quantitativo.

O *cluster* de genes de *X. fastidiosa* envolvidos na montagem da fímbria do tipo I está mostrado na Figura 18. Ele é composto por um provável operon de quatro genes que codificam a subunidade estrutural da fímbria do tipo I (XF0083), uma *chaperone* (XF0082), um *usher* de membrana externa (XF0081) e uma adesina fimbrial (XF0080) (Figura 18A). Dois outros parálogos desta adesina (XF0077 e XF0078) localizam-se a jusante do operon, e um deles apresenta seqüência divergente (XF0078) e o outro está ausente (XF0077) na linhagem J1a12 (Koide *et al.*, 2004a). Análise por qRT-PCR do gene XF0083 mostrou que ele é um pouco mais expresso no mutante *rpoN* em relação a linhagem J1a12, resultado semelhante ao obtido na análise por microarranjo de DNA (Figura 18B).

Seis ORFs foram anotadas como parálogos de *pilA* no genoma da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa* (XF0487, XF0538, XF0539, XF1791, XF2539 e XF2542) (Simpson *et al.*, 2000). Estas ORFs estão distribuídas agrupadas (XF0538-XF0539 e XF2539, XF2542) ou individualmente em diferentes regiões do genoma, geralmente associadas com outros genes envolvidos na biogênese da fímbria tipo IV.



Figura 18: Regulação negativa dos genes envolvidos na biogênese da fímbria do tipo l pelo fator σ^{N} em *X. fastidiosa.* (A). Organização genômica do *cluster* contendo seis genes envolvidos na produção da fímbria tipo I. Os números sobre as ORFs indicam quantas vezes os respectivos genes são mais expressos no mutante *rpoN* em relação a linhagem selvagem (dados da tabela 10). (B). Análise por RT-PCR quantitativo comparando a expressão do gene XF0083 na linhagem selvagem e no mutante *rpoN*. RNAs extraídos da linhagem J1a12 e do mutante *rpoN*, crescidos em meio PWG, foram tratados com DNAse e convertidos a cDNA. O PCR em tempo real foi feito com Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen), usando oligonucleotídeos específicos. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta ACT}$ utilizando o gene dnaQ como controle endógeno. Os dados mostrados são a média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

Seqüências de aminoácido de cinco destes parálogos de *pilA* foram alinhadas (a ORF XF1791 é um pseudogene e não foi incluída no alinhamento) e assinaturas características de proteínas pilinas foram identificadas (Figura 19A). Em um trabalho anterior (Koide *et al.*, 2004a) foi demonstrado que a ORF XF2542 da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa* apresenta seqüência divergente (65% de identidade de aminoácido) com relação à ORF da linhagem J1a12 (usada neste trabalho). Assim, a seqüência de aminoácidos de XF2542 da linhagem J1a12 também foi incluída no alinhamento e revelou as mesmas assinaturas típicas de proteínas pilinas da fímbria tipo IV (Figura 19A). Os parálogos de PilA de *X. fastidiosa* pertencem a subfamília tipo A das pilinas, que possuem uma seqüência líder curta e o primeiro aminoácido na proteína madura é fenilalanina (Figura 19A) (Craig *et al.*, 2004). Um típico sítio de clivagem da pré-pilina por peptidase pode ser observado após um resíduo

conservado de glicina, e há um resíduo conservado de glutamato e um par de tirosinas (Y24 e Y27), que parecem promover a dimerização durante a montagem do filamento polimérico de subunidades de pilina (Figura 19A) (Craig *et al.*, 2004).

Α.	Sítio de Clivagem	
Sequêr	ncia Líder 🚽 🔄 Região Hidrofóbica 🔄	
J1a12_XF2542	-MKKQQGFTLIELMIVIAIIAILVAIALPMYQNYVARSQVTAGLAEITPGKVQAEILFSD	59
9a5c_XF2542	-MKKQQGFTLIELMIVIAIIAILAAIALPMYQNYVARSQIAAALAEITPGKVQAEIRIAD	59
9a5c_XF2539	-MKKQQGFNLIELMIVIAIIAVLAAIALPMYQNYVARSQLTAALADITPGKVQAESLIAD	59
9a5c_XF0487	MMKKQQGFNVIELMILIVIIAVLTAITLPIYQYYIAKSQVTAALTDITPGKVYTEVRLAS	60
9a5c_XF0539	MEKRQQGFTLLEVMVTLIVPAVLGAITLPLYQRYVAKTQVTAALADITPGKIGAEARIAA	60
9a5c_XF0538	-MKAPKGFTLAELMVVIGIIAILAAIALPLYQHYVAKAQVMAALADITPGRTPAEIILTE	59
	* :**.: *:*: : : *:* **:** *:*:*: *.*:*: *.*:*: :*:	
J1a12_XF2542	AGTKTAITTPETIGLRTATTRCSSIAVNLTPSAGTG	95
9a5c_XF2542	GQAATTPNAIGLRAPTPRCGTIVVDIAPSAASQAATTPNAIGLRAPTPRCGTIVVDIAPSAAS	91
9a5c_XF2539	GKSTSNASDIGLRTDTTRCG-ITVKVD-AAGTA	90
9a5c_XF0487	GMPRTTSPNDIGLHTTTTRCHHIDVSVDTAATESKTDSVGHRTTTLTKAPTS	112
9a5c_XF0539	GAPSTDVPGDIALPPVTDRCRNIAVHVEAGTRGLSSVES	99
9a5c_XF0538	PVLGSWIKGTTAATKPHQLGLASSTPRCHNISVFMTGGSHMPQMDGDT	107
	· • • * · * * * • • • • • • • • • • • •	
J1a12 XF2542	TIVCTITGNSOVNGOTTTWTRSADNTSGOGGTNNG	130
9a5c XF2542	AITCTMIGNAOVNNOTITLTRIADNNAGOGGVNTG	126
9a5c XF2539	NITCKVKGNSOVNDKTIAWDRTSDNSAGTNGVNNG	125
9a5c_XF0487	TITCTINGNNAVNHKFIQWLRMADLNWISSDNDGNDLD	150
9a5c_XF0539	SITCIMNGNAEVDGRFIRWFRLLDRSNATDYVAYGSFTFDDHKNLDKKKDESL	152
9a5c_XF0538	YITCVIRGNALVNNKAIKWIMLNTAYGLYEVIRDPRGGTHPPIKGPPVG	156
	. : ** *: : *	
J1a12_XF2542	-GLWSCTTTVAT-TLSPSTCTSTAKNG 155	
9a5c_XF2542	-GNWTCTTTAPA-ALTPAGCTGVS 148	
9a5c_XF2539	-GVWTCSSTVTSDALRPSGCIASK 148	
9a5C_XF0487	-ARWFCLTNVAE-ALRPIACTDALPQTPTGS 179	
9a5C_XF0539	YGKWFCVTNVDL-ELKPAGCVAEEQLPVKAAFAKNA 187	
9a5C_XE0538	-GRWECVIDVPE-PLWPAGCKGALPPRSSDGI 186	
Β.	• • •	
2,5	т	
2		
רא ²		
ati		
Φ 1,5 -		
. aĩ	T I	
S I -		
$\mathbf{X}_{0.5}$		
Ш 0,5		
0 +		
XF0487	XF0539 XF1791 XF2539 XF2542	

Figura 19: Análise dos parálogos de PilA. (A). Alinhamento da seqüência de aminoácidos dos candidatos a pilina de *X. fastidiosa*. Aminoácidos idênticos são indicados por asterisco, substituições conservadas são indicadas por dois pontos e substituições semi-conservadas são indicadas por pontos. Assinaturas características de proteínas pilinas são indicadas, incluindo a seqüência líder, o sítio de clivagem e a região hidrofóbica. O alinhamento foi feito com ClustalW 1.83. (B). Expressão de genes parálogos da pilina. Expressão foi avaliada por qRT-PCR usando RNA das linhagens J1a12 (verde) e *rpoN* (vermelho) cultivadas em PWG. Os dados mostrados são a média e o desvio padrão de quatro réplicas biológicas independentes. Expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o gene *dnaQ* como controle endógeno (XF2157).

Dados dos experimentos de microarranjos de DNA indicaram somente o parálogo XF2542 de *pilA* como diferencialmente expresso no mutante *rpoN* em relação a linhagem selvagem J1a12 (Tabela 10). Para confirmar estes dados, foram desenhados oligonucleotídeos específicos baseados na seqüência do genoma da linhagem 9a5c (exceto para XF2542, que foi usada a seqüência da linhagem J1a12) e análise por qRT-PCR foi realizada, usando RNA das linhagens J1a12 e *rpoN*. Os resultados de qRT-PCR confirmaram os dados dos microarranjos de DNA, mostrando que somente XF2542 teve uma grande redução no nível de seu transcrito no mutante *rpoN* (razão *rpoN*/J1a12 0,021 \pm 0,016, ou seja, mais de 40 vezes menos expresso no mutante em relação a linhagem selvagem). XF0539 mostrou uma pequena redução na expressão, XF2539 mostrou uma pequena indução e XF0487 e XF1791 não mostraram mudança na expressão (Figura 19B). XF0538 não foi testado porque provavelmente forma um operon com XF0539. Estes dados indicam que os parálogos de *pilA* são expressos na linhagem J1a12 de *X. fastidiosa*, mas provavelmente somente o gene XF2542 é diretamente regulado por σ^{N} .

Considerando que a região promotora do gene XF2542 pode apresentar diferença de següência na linhagem J1a12 em relação à linhagem 9a5c, já que a ORF mostrou-se bastante divergente (Koide et al., 2004a), resolvemos següenciar esta região antes de mapear o início de transcrição deste gene. Toda a região promotora do gene pilA (região intergênica de 560 nt entre as ORFs XF2541/XF2542) e o início de sua região codificadora (78 nt a partir do códon de início de tradução, que não havia sido seqüenciado em Koide et al., 2004a) foi amplificada por PCR a partir do genoma da linhagem J1a12, clonada e seguenciada. Quatro clones independentes foram seguenciados nas duas fitas e a següência resultante mostrou pequenas diferenças em relação a següência da linhagem 9a5c na região promotora (547/566, 96% de identidade) (Figura 20). No início da região codificadora de XF2542 a següência foi praticamente idêntica, o que já era esperado, pois as pilinas apresentam a região amino-terminal altamente conservada (següência não mostrada). O sítio de início de transcrição de XF2542 foi determinado por ensaio de extensão de oligonucleotídeo, usando RNA das linhagens J1a12 e rpoN. Foi detectado um produto de extensão forte, correspondendo ao sítio de início de transcrição em uma timina localizada 66 pb a montante do códon de início de tradução (ATG) na linhagem J1a12, que não foi observado na linhagem rpoN (Figura 21A).

Query	1	TCGCGAGCCTGAACCAAAGCTTTTATTCACTACATCATTGACAACAACAGGACGTTACCA	60
Sbjct	2414148	TCGCGAGCCTGAACCAAAGCTTTTATTCACTACATCATTGACAACAACAGGACGTTGCCA	2414207
Query	61	AAACCCACAGCACCGCAGTGGATCCATATTGCGTGCTCACACCTTGAGACTTCGCCTCAG	120
Sbjct	2414208	AAATCCACAGCACCGCAGTGGATCCATGTTGCGTGCTCACGCATTGAGACTTCGCCTCAG	2414267
Query	121	GTCACTTCATCTCCTTGACCTGTCGCAACGTACCTCTCATCGTTTCCCTGCGCAGACAAC	180
Sbjct	2414268	GTCACTCCATCTCCTTGACCTGTCGCAAAGTACCTTCCATCGTTTCCCTGCGCGGACAAC	2414327
Query	181	ACCCCGACCAGGCAAACGAACCAATGGAACAAACGCAAACAGTTGTCAGCATCTCTAACT	240
Sbjct	2414328	accccgaccaggcaaacgaaccaatggaacaaacgcaaacagttgtcagcatctctaacc	2414387
Query	241	GATCCGATGGATTGGCGATAGGCCCTCCCAAGGACCACTGTTGACACTGCCATCAAG	300
Sbjet	2414388	CATCCCCTGGATTGGTGATAGGCCCTGCCAAGGACCACTGTTGACACTGCCATCATCAAG	2414447
Query	301	CTGCGTTCTCACCCCATCCCGCAACCATGCTTTGTATTGCGCCTTTCAATATTGCGATGC	360
Sbjet	2414448	CTGCGTTCTCACCCCATCCCGCAACCATGCTTTGTATTGCGCCTTTCAATATTGCGATGC	2414507
Query	361	ATAACGCATAACGGCAGGTCCTGACCCAATACGGCGTTTTTAACACGCCTCTTCTCCAAA	420
Sbjet	2414508	ataacgcataacggcaggtcctgacccaatadggcgtttttaacacgcdtcttctcdaaa	2414567
Query	421	AGAGAAAGAGTGATAAATATCAATTCTATTTATTGATAAAAATCACATTATTGGCACACC	480
Sbjet	2414568	<u>agagaaaga</u> gtgataad <u>tatcaa</u> ttcta <u>tti</u> tttgataaaaatcacatta <u>ttggcad</u> acc	2414627
Query	481	TICTGCTTAAGTCATCTTGGCCAGTGCTGGACAACGCATTACAGCAACGCTGGATTTCTTA	540
Sbjct	2414628	TICTGCTTAAGTCATCTIGCCCAGTGCTGGACAACGCATT-CAGCAACGCTGGATTTCTTA	2414686
Query	541	CCAACGCTATTTAAGGATTCATCATG 566	
Sbjct	2414687	CCAACGCTATTI <mark>AAGGA</mark> TTCAT <mark>GATG</mark> 2414712	

Figura 20: Comparação de seqüência da região promotora de XF2542 entre as linhagens J1a12 e 9a5c de X. fastidiosa. A região intergênica completa entre as ORFs XF2541 e XF2542 foi seqüenciada a partir de DNA da linhagem J1a12 (*Query*) e alinhada com seqüência do genoma da linhagem 9a5c (*Subject*), usando programa BLASTN. O significado das seqüências conservadas destacadas em vermelho está definido na Figura 21.

Quando analisado em relação a seqüência da linhagem J1a12, este início de transcrição permite o posicionamento perfeito dos elementos conservados -12 GC e -24 GG, típicos de um canônico promotor dependente de σ^N (Figura 21B). Estes resultados indicam que XF2542 é transcrito de um promotor dependente de σ^N e confirmam experimentalmente a predição *in silico* de um promotor σ^N para este gene (Tabela 9; Studholme *et al.*, 2000). Um possível sítio de ligação para IHF (Fator de Integração ao Hospedeiro) foi identificado entre as posições -45 e -80 (Figura 21B). Sítios de ligação de IHF são encontrados em alguns promotores dependentes de σ^N , e tem sido proposto que a ligação de IHF dobra o DNA permitindo interação entre σ^N -RNA polimerase e o ativador de σ^N ligado a montante (Buck *et al.*, 2000). *X. fastidiosa* possui dois genes codificando as subunidades de IHF (XF0743 e XF2437) e uma seqüência repetida invertida está presente na posição -97, que poderia ser

um possível sítio de ligação do ativador de σ^{N} . Todos estes elementos *cis* conservados apresentam exatamente a mesma seqüência nas linhagens J1a12 e 9a5c, indicando que o mecanismo de ativação de *pilA* deve ser o mesmo nas duas linhagens (Figura 20).



B. CAGCATCTCTAACTGATCCGATGGATTGGCGATAGGCCCTCCCAAGGACCACTGTTGAC ACTGCCATCATCAAGCTGCGTTCTCACCCCATCCCGCAACCATGCTTTGTATTGCGCCT TTCAATATTGCGATGCATAACGCATAACGGCAGGTCCTGACCCAATAC<u>GGCGTTTTTAA</u> <u>CACGCCTCTTCTCCCAAAAGAGAAAGAG</u>AGTGATAAA<u>TATCAA</u>TTCTA<u>TTT</u>ATTGATAAAAA TCACATTAT**TGGCAC**ACCTT**CTGC**TTAAGTCATCT**T**GCCAGTGCTGGACAACGCATTAC AGCAACGCTGGATTTCTTACCAACGCTATTT<u>AAGGA</u>TTCATC<u>ATG</u>

Figura 21: Análise da região promotora do gene *pilA* (XF2542). (A). Determinação do sítio de início de transcrição de *pilA*. Ensaio de extensão de oligonucleotídeo foi realizado na região promotora de *pilA* usando RNA das linhagens J1a12 e *rpoN* e o oligonucleotídeo marcado XF2542EXT. Produtos de extensão foram separados em gel de poliacrilamidauréia. Uma seqüência de DNA do fago M13mp18 foi usada como marcador de peso molecular. A seta indica a banda correspondente ao sítio de início de transcrição. (B). Seqüência de nucleotídeos (J1a12) da região promotora de *pilA*. O sítio de início de transcrição mapeado (+1) e os elementos de seqüência conservados -12 e -24 do promotor σ^{N} estão destacados em negrito e sombreados. O sítio de início de tradução (ATG) e a seqüência Shine-Dalgarno estão sublinhados. Um possível sítio de ligação de IHF (seqüência tracejada) e uma seqüência repetida invertida (seqüência pontilhada) estão indicados.

Como já mencionado, o locus XF2545/XF2546 codifica proteínas que são muito similares ao sistema de dois componentes PiIR/PiIS, que regula a produção de pilina em *P. aeruginosa* (Ishimoto e Lory, 1992). PiIS é a histidina quinase responsável pela fosforilação do ativador de σ^{N} PiIR, que uma vez fosforilado ativa a transcrição do gene *pilA* a partir de um promotor dependente de σ^{N} (Ishimoto e Lory, 1992). De fato, inserção por transposon no ortólogo *pilR* da linhagem Temecula de
X. fastidiosa causou perda da fímbria tipo IV (Li *et al.*, 2007). Para verificar se a proteína PilR liga na região promotora do gene *pilA* (XF2542), a região codificadora completa do gene *pilR* (XF2545) de *X. fastidiosa* foi clonada em vetor de expressão de *E. coli*, para expressar, purificar e fazer ensaios de ligação da proteína recombinante His-PilR com a sonda da região promotora de *pilA* (Figura 22).



Figura 22: Expressão, purificação e ensaios de ligação do ativador de σ^{N} PiIR a região promotora do gene *pilA*. (A). Análise de extratos de proteínas, por SDS-PAGE, das colônias transformantes de *E. coli* contendo a construção pPROEX(*pilR*) mostrou indução da proteína His-PiIR (seta), após adição de IPTG, a 30 °C ou a 37 °C. (B). Nestas condições de indução a proteína ficou localizada em corpos de inclusão, na forma insolúvel. (C). Indução da expressão em temperatura mais baixa resultou em maior quantidade de His-PiIR solúvel, purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel. (D). EMSA indicou ausência de ligação de His-PiIR purificada a região promotora de *pilA*. Em A, B e C os números indicam tempos de indução em horas, a partir da adição de IPTG (tempo 0, antes da adição de IPTG); S: fração solúvel; I: fração insolúvel (corpos de inclusão); N, L1, L2, E1 e E2 indicam fração não ligada, lavagens e eluições da resina de níquel nos passos de purificação de His-PiIR, respectivamente; P: padrão de peso molecular *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). Em D, canaleta 1: sonda *pilA* marcada (640 pb); canaletas 2-7: sonda *pilA* marcada, incubada com 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 nM de His-PiIR purificada.

A proteína de fusão His-PilR (tamanho esperado de aproximadamente 54 kDa) foi bastante induzida em E. coli, uma e três horas após adição de 0,5 mM de IPTG a 30 °C e a 37 °C (Figura 22A), mas ficou totalmente insolúvel nestas condições de indução (Figura 22B). Células cultivadas em temperatura mais baixa (22 °C) expressaram pelo menos um pouco da proteína His-PilR na forma solúvel, permitindo sua purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel (Figura 22C). A capacidade de His-PilR purificada de ligar na região promotora de pilA foi avaliada por EMSA. Incubação de diferentes guantidades da proteína (de 10 a 5000 nM) não provocou gualquer alteração na migração do fragmento de DNA marcado da região promotora de pilA, pois as amostras contendo a sonda e a proteína em várias concentrações (canaletas 2 a 7) migraram da mesma maneira que a sonda livre (canaleta 1), em gel não desnaturante de poliacrilamida 5% (Figura 22D). Este resultado negativo provavelmente é conseqüência das condições utilizadas no experimento e não uma evidência de que PilR não ativa o gene pilA. Um dos motivos que poderiam ser apontados para a ausência de ligação é que PilR necessita ser fosforilado para ligar ao DNA de forma eficiente, ou ainda, a presença da cauda de histidina poderia atrapalhar a interação.

Para verificar se a biogênese das fímbrias foi afetada no mutante *rpoN*, as células foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão. De um modo geral, foram observadas numerosas fímbrias curtas e raras fímbrias longas nos pólos das células da linhagem de citros J1a12 de *X. fastidiosa* (Figura 23A e 23B). Resultados similares foram descritos para linhagens de videira de *X. fastidiosa*, que possuem duas classes de fímbrias, fímbrias tipo IV longas e fímbrias tipo I curtas (Meng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). O mutante *rpoN* ainda apresenta fímbria longa e não houve diferenças detectáveis nas fímbrias curtas quando comparado às fímbrias expressas pelas células da linhagem selvagem (Figura 23C e 23D).

Em artigo recente foi demonstrada, para linhagem Temecula de *Xylella fastidiosa*, a presença destes dois tipos de fímbria na célula, com a fímbria do tipo I (curta) tendo papel na formação de biofilme e a fímbria do tipo IV (longa e polar) sendo importante para locomoção do tipo *twitching motility* e migração na planta (Meng *et al.*, 2005). Para verificar se σ^{N} tem papel na formação de biofilme foram feitos ensaios quantitativos com culturas da linhagem selvagem e do mutante *rpoN* cultivadas estaticamente em meio PWG, em tubos de polipropileno (Figura 24A).



Figura 23: Fímbrias das linhagens J1a12 e *rpoN* de *X. fastidiosa*. Micrografia eletrônica de transmissão de fímbrias presentes em células das linhagens J1a12 (**A** e **B**) e *rpoN* (**C** e **D**) coradas com ácido fosfotungstico 2%. Painéis A e C mostram grande presença de fímbrias curtas na superfície das células das duas linhagens, sobretudo nas regiões polares, e painéis B e D mostram poucas fímbrias longas (setas), também presentes nas duas linhagens. Barras, 0,3 µm.

As duas linhagens formaram um anel de células aderidas à superfície do tubo e a formação do biofilme aumentou durante o crescimento bacteriano, alcançando níveis máximos na fase estacionária (Figura 24B). Entretanto, a linhagem mutante produziu em torno de quatro vezes mais biofilme que a linhagem selvagem em todas as fases de crescimento (Figura 24C). Análise visual de culturas mantidas em *erlemeyers* de vidro (borosilicato), tanto em meio PWG quanto em meio XDM₂, também indicou acentuado aumento na formação de biofilme pelo mutante *rpoN* em relação a linhagem selvagem (dados não mostrados). A capacidade de autoagregação de células da linhagem J1a12 e do mutante *rpoN* também foi investigada. A linhagem selvagem formou auto-agregados numerosos e bem pequenos, enquanto o mutante *rpoN* formou grandes agregados célula-célula. Estes grumos de células foram observados mais facilmente durante a fase estacionária e resultados representativos são mostrados (Figura 24D). Assim, σ^{N} parece desempenhar um controle negativo na adesão de *X. fastidiosa* a superfícies abióticas, como polipropileno e borosilicato (vidro), e na agregação célula-célula.



Figura 24: Formação de biofilme e agregação célula a célula da linhagem selvagem J1a12 e do mutante *rpoN*. (A). Curvas de crescimento para linhagem selvagem e mutante *rpoN* em meio PWG a 25 °C. (B). Tubos com culturas cultivadas por 14 dias e 31 dias, corados com cristal violeta, foram fotografados. (C). Comparação da formação de biofilme em *X. fastidiosa* J1a12 e no mutante *rpoN* após diferentes dias de incubação das culturas paradas em meio PWG. Biofilmes foram corados com cristal violeta. O corante foi removido dos tubos e quantificado em espectrofotômetro a 600 nm. O resultado mostrado corresponde à média e ao desvio padrão de cinco réplicas para cada ponto do experimento. (D). Auto-agregação de células das linhagens J1a12 e *rpoN* de *X. fastidiosa*. As duas linhagens foram cultivadas em 50 ml de PWG e após 18 dias de incubação sem agitação a 25 °C, as culturas foram avaliadas por observação visual para formação de agregados de células dentro do meio líquido. Amostras foram retiradas das culturas líquidas, transferidas para placas de Petri e fotografadas.

O fenômeno de *twitching motility* é um mecanismo de locomoção em superfícies, independente de flagelo, mediado pela fímbria tipo IV. Este fenótipo geralmente é analisado pela presença de franjas microscópicas nas bordas da colônia (Meng *et al.*, 2005) ou como zonas de expansão das células inoculadas através do ágar na interface de contato com a placa (Mattick, 2002). Foram feitas numerosas tentativas de observar franjas microscópicas nas bordas das colônias da

linhagem J1a12 e do mutante *rpoN*, com auxílio de um estereomicroscópio, mas não foi observada qualquer expansão na borda das colônias que pudesse confirmar ocorrência de *twitching motility*. Nos ensaios de inoculação das células para verificar zonas de expansão na interface ágar/placa, observamos zonas de expansão tanto na linhagem J1a12 quanto no mutante *rpoN* (Figura 25). Não foi observada diferença no diâmetro das zonas de motilidade apresentadas pela linhagem J1a12 (0.817 ± 0.08 cm) e pelo mutante *rpoN* (0.820 ± 0.106 cm). Portanto, a linhagem J1a12 apresentou o fenômeno de *twitching motility* e este processo não foi afetado no mutante *rpoN*.



Figura 25: Ensaios de twitching motility. Zonas de expansão da colônia por *twitching* formada por *X. fastidiosa* J1a12 e pelo mutante *rpoN* na interface entre o ágar e o fundo da placa. As linhagens foram inoculadas através do ágar em placas PWG e cultivadas por 30 dias a 25 °C. O ágar foi removido e as células foram coradas com *Coomassie blue*. Barras, 1 cm.

4.3.3 Resposta transcricional a carência de nitrogênio e o papel de σ^{N}

Microarranjos de DNA foram utilizados para revelar as mudanças globais na expressão gênica de células da linhagem J1a12 de *X. fastidiosa* submetidas à carência de nitrogênio. Os experimentos comparam o perfil de expressão de células submetidas à abrupta carência de nitrogênio (meio de cultura XDM₀) durante 2, 8 e 12 horas em relação a células cultivadas em meio definido contendo os aminoácidos serina, metionina, asparagina e glutamina como fonte de nitrogênio (meio de cultura XDM₂, tempo 0). As taxas de expressão relativa de cada ponto da série temporal foram calculadas em relação ao tempo zero e os dados de cada ponto

correspondem a três réplicas biológicas independentes. A transferência para um meio de cultura sem qualquer fonte de nitrogênio (XDM₀) acarretou em mudança na expressão de 448 genes diferentes, que tiveram sua expressão alterada em pelo menos um dos pontos da série temporal, sendo 252 genes induzidos e 196 genes reprimidos em carência de nitrogênio (Tabela 11). A Tabela 11 indica ainda o número de genes diferencialmente expressos em cada ponto da série e a quantidade de genes com expressão alterada em mais de um ponto da série, sendo que apenas um pequeno número foi induzido (7 genes) ou reprimido (9 genes) nos três tempos de carência de nitrogênio. Uma lista completa dos genes diferencialmente expressos é fornecida nas Tabelas suplementares S1 e S2.

Tempo (horas)	Induzidos	Reprimidos
2	32	9
8	52	58
12	62	48
2 e 8	36	1
2 e 12	2	0
8 e 12	61	71
2, 8 e 12	7	9
Subtotal	252	196
Total	448	

Tabela 11: Número de genes diferencialmente expressos na linhagem J1a12 de *X. fastidiosa* submetida a duas, oito e doze horas de carência de nitrogênio.

Uma análise detalhada do perfil de expressão dos genes ao longo da série temporal para definição de grupos de genes que apresentam o mesmo perfil transcricional e, portanto, podem ser regulados por um mesmo mecanismo ou podem desempenhar funções relacionadas, requer uma análise por agrupamento, utilizando algoritmos como *K-means*, que ainda não foi realizada para estes dados. O total cumulativo de genes diferencialmente expressos em cada ponto individual (2, 8 e 12 horas de carência de nitrogênio) foi: 77, 156 e 132 para os genes induzidos, e 19, 139 e 128 para os genes reprimidos, respectivamente. Estes dados indicam que o número de genes diferencialmente expressos alcançou o máximo no tempo de 8 horas e então teve um declínio no tempo de 12 horas (Figura 26).



Figura 26: Número de genes diferencialmente expressos em *X. fastidiosa* J1a12 após 2, 8 e 12 horas de carência de nitrogênio. Os valores são cumulativos e um mesmo gene pode estar representado em mais de um tempo. O número de genes induzidos ou reprimidos em cada tempo foi estabelecido a partir de análises de microarranjo de DNA, utilizando triplicatas biológicas das amostras para cada ponto da série temporal. Foram considerados diferencialmente expressos os genes com pelo menos 4 de 6 réplicas fora do intervalo de confiabilidade, estabelecido a partir de hibridizações homotípicas.

Os 448 genes que tiveram sua expressão afetada por carência de nitrogênio foram agrupados em categorias funcionais de acordo com as categorias definidas no banco de dados do genoma de *X. fastidiosa* (Figura 27). Embora existam genes em todas as nove categorias funcionais, algumas categorias apresentam maior número de genes. Assim, 174 genes (38% do total) estão na categoria VIII (proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas), sendo 122 genes induzidos e 52 genes reprimidos. Para os demais genes (274) é possível atribuir uma provável função por comparação de següência em relação a genes ortólogos com função conhecida em outras bactérias. Outras categorias contendo muitos genes diferencialmente expressos são: categoria IIIB (metabolismo de RNA) com 30 genes; categoria IIA (biossíntese de aminoácidos) com 23 genes; categoria IC (metabolismo energético de carbono) com 20 genes; categoria VA (transporte) com 20 genes; e categoria IIIC (metabolismo de proteínas) com 19 genes. Das categorias com predominância de genes induzidos em relação aos genes reprimidos destacam-se: categoria ID (funções regulatórias, 12 induzidos para 4 reprimidos) e categoria VIA (funções relacionadas a fagos e profagos, 8 induzidos para 1 reprimido). Já as categorias com

predominância de genes reprimidos em relação aos genes induzidos estão relacionadas principalmente com funções do metabolismo: categoria IB (metabolismo intermediário central, 10 reprimidos para 5 induzidos); categoria IC (metabolismo energético de carbono, 17 reprimidos para 3 induzidos); categoria IIIC (metabolismo de proteínas, 16 reprimidos para 3 induzidos); e categoria VIIC (produção de toxinas e detoxificação, 10 reprimidos para 4 induzidos). As funções de alguns dos genes diferencialmente expressos em resposta a carência de nitrogênio serão descritas abaixo.

Capacidade de Transporte. Alteração na expressão de 20 genes codificando proteínas relacionadas a transporte (8 genes induzidos e 12 genes reprimidos) parece indicar que adaptação da capacidade de transporte da célula é uma das respostas à carência de nitrogênio. Há uma predominância de transportadores do tipo ABC, possivelmente envolvidos no transporte de açúcares, aminoácidos e ferro. Indução de sistemas de transporte de diferentes fontes alternativas de nitrogênio é uma resposta típica de carência de nitrogênio (Zimmer *et al.*, 2000; Silberbach *et al.*, 2005), mas a repressão de um número até maior de genes parece indicar que o transporte de certas substâncias, inclusive aminoácidos, pode estar diminuído nesta situação.

Metabolismo de nitrogênio e biossíntese de aminoácidos. Em duas horas de carência de nitrogênio foi observado um aumento na transcrição dos genes *gltD* (XF2709) e *gltB* (XF2710), que codificam as duas subunidades da enzima glutamato sintase (GOGAT), mas o gene *glnA* (XF1842), que codifica a enzima glutamina sintetase (GS), não teve sua expressão alterada. Assimilação de amônia pela via de alta afinidade GS/GOGAT é mais efetiva do que assimilação pela enzima glutamato desidrogenase. Foi observada indução de alguns genes codificando enzimas envolvidas no catabolismo de aminoácidos ou proteínas, como *rocF* (arginina deaminase), *tdcB* (treonina desidratase), *pip* (prolina iminopeptidase) e *pepQ* (prolina dipeptidase). A biossíntese de aminoácidos foi bastante afetada, com 13 genes sendo induzidos e 10 genes sendo reprimidos. Em parte, isto se deve ao fato que a carência de nitrogênio foi induzida a partir do meio XMD₂, cuja fonte de nitrogênio são os aminoácidos serina, metionina, asparagina e glutamina. De fato, os genes induzidos codificam para enzimas que fazem parte das vias de biossíntese de glutamato, metionina e cisteína.

116

Metabolismo de carbono e geração de energia. Genes das principais vias do metabolismo de carbono foram reprimidos em carência de nitrogênio, incluindo três genes da glicólise, gene da enzima piruvato desidrogenase, sete genes do ciclo de *Krebs*, três genes da cadeia de transporte de elétrons e dois genes que codificam para as subunidades alfa e beta da ATP sintase.



Figura 27: Genes diferencialmente expressos em resposta a carência de nitrogênio, agrupados por categorias funcionais, de acordo com o banco de dados do genoma de X. fastidiosa. I. Metabolismo Intermediário: IA. Degradação, IB. Metabolismo intermediário central, IC. Metabolismo energético do carbono, ID. Funcões regulatórias. II. Biossíntese de pequenas moléculas: IIA. Biossíntese de aminoácidos, IIB. Biossíntese de nucleotídeos, IIC. Biossíntese de acúcares e acúcar-nucleotídeos, IID. Cofatores, grupos prostéticos, biossíntese de carregadores, IIE. Biossíntese de ácidos graxos e ácido fosfatídico, IIF. Biossíntese de poliaminas. III. Metabolismo de macromoléculas: IIIA. Metabolismo de DNA, IIIB. Metabolismo de RNA, IIIC. Metabolismo de Proteína. IV. Estrutura celular: IVA. Componentes da membrana, IVB. Mureína sacculus, peptidoglicano, IVC. Polissacarídeos, lipopolissacarídeos, e antígenos de superfície, IVD. Estruturas da superfície. V. Processos celulares: VA. Transporte, VB. Divisão celular. VI. Elementos genéticos móveis: VIA. Funções relacionadas a fagos e profagos, VIB. Funções relacionadas a plasmídeos, VIC. Funções relacionadas a transposon e intron. VII. Patogenicidade, virulência, e adaptação: VIIC. Produção e detoxificação de toxina, VIIE. Exopolissacarídeos, VIIG. Adaptação a condições atípicas, VIIH. Outros. VIII. Hipotéticas: VIIIA. Proteínas conservadas hipotéticas, VIIIB. Proteínas hipotéticas. IX. ORFs com categoria indefinida.

A identificação de membros do regulon σ^N de *Xylella fastidiosa* através de análises de microarranjo de DNA foi iniciada com os experimentos comparando o perfil transcricional das linhagens J1a12 e *rpoN* cultivadas em meio PWG (Tabela 10). Para tentar encontrar membros do regulon σ^N envolvidos na resposta a carência de nitrogênio foi feita análise de microarranjo de DNA comparando o perfil transcricional total da linhagem J1a12 em relação à linhagem *rpoN*, com as duas linhagens cultivadas na condição de duas horas de carência de nitrogênio. Análise dos dados obtidos a partir de três lâminas, feitas com RNAs extraídos de três culturas biológicas independentes, revelou 22 genes diferencialmente expressos, sendo que 7 genes tiveram expressão reduzida (positivamente regulados por σ^N) e 15 genes tiveram expressão aumentada (negativamente regulados por σ^N) no mutante *rpoN* em relação a linhagem selvagem J1a12 (Tabela 12).

Tabela 12: Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante *rpoN* comparada a linhagem J1a12 em condição de carência de nitrogênio.

Gene.ID ^a	Produto	rpoN/J1a12 ^b	
Genes positivamente regulados por RpoN			
XF2542	proteína estrutural da fímbria tipo IV	0,07	
XF2272	5-metilltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferase	0,22	
XF1819	desidratase do catabolismo de treonina	0,33	
XF1121	5,10-metilenotetrahidrofolato redutase	0,35	
XF2699	fator de terminação de transcrição Rho	0,39	
XF0180	proteína hipotética	0,49	
XF2207	transportador de aminoácidos catiônicos	0,58	
Genes negativamente regulados por RpoN			
XF1109	proteína hipotética	3,71	
XF2343	proteína de recombinação N	3,10	
XF0887	manosiltransferase	3,05	
XF1830	ativador de nitrilo hidratase	2,87	
XF2551	proteína hipotética conservada	2,75	
XF1658	proteína repressora relacionada a fago	2,46	
XF1781	proteína hipotética	2,45	
XF1117	proteína hipotética	2,36	
XF2555	lisil-tRNA sintetase	2,35	
XF1469	proteína hipotética conservada	2,25	
XF1078	proteína de uptake de DNA	2,23	
XF0412	proteína ligadora de ATP de sistema de transporte ABC (nitrato)	2,20	
XF0318	NADH-ubiquinona oxidoredutase, subunidade NQO14	2,11	
XF0221	proteína hipotética	1,91	
XF2377	proteína hipotética	1,75	

^a Função predita baseada em similaridade de seqüência. ^b Expressão relativa do gene nas linhagens *rpoN*/J1a12 submetidas a duas horas de carência de nitrogênio. Foram considerados diferencialmente expressos os genes com pelo menos 4 de 6 réplicas fora do intervalo de confiabilidade, estabelecido a partir de hibridizações homotípicas.

Os sete genes positivamente regulados por σ^N foram diferencialmente expressos em carência de nitrogênio (Tabelas S1 e S2) sendo que cinco deles foram bastante induzidos em até mais de um ponto da série temporal. Assim, estes genes (XF0180, XF1121, XF1819, XF2272 e XF2542) provavelmente são induzidos em carência de nitrogênio através de σ^{N} . Destes prováveis membros do regulon σ^{N} , apenas o gene pilA (XF2542, que codifica pilina da fímbria tipo IV) tinha sido detectado na análise do microarranjo comparando as linhagens em meio PWG (Tabela 10). Os 15 genes que tiveram expressão aumentada no mutante rpoN em relação à linhagem J1a12 são regulados negativamente por este fator sigma provavelmente por mecanismos indiretos. Onze destes quinze genes foram diferencialmente expressos em carência de nitrogênio, sendo 6 induzidos e 5 reprimidos (Tabelas S1 e S2). A grande quantidade de dados gerados dos experimentos de microarranjo de DNA descritos neste item (série temporal do perfil transcricional da linhagem J1a12 submetida à carência de nitrogênio, e genes do regulon σ^N associados a esta limitação nutricional) foi obtida apenas recentemente, o que impossibilitou uma análise mais detalhada de todos os processos envolvidos.

Inesperadamente, a expressão do gene glnA (XF2542), que codifica para a enzima glutamina sintetase, não foi afetada em nenhuma das análises de microarranjo de DNA, a despeito deste gene ser induzido em carência de nitrogênio de modo dependente de σ^{N} e NtrC em várias bactérias. Considerando que foi encontrado um bom sítio de ligação para σ^{N} na região promotora do gene glnA de X. fastidiosa (Tabela 9) foram realizados ensaios de extensão de oligonucleotídeo para tentar mapear o início de transcrição deste gene e confirmar a existência deste sítio de ligação de σ^N predito *in silico*. Foi detectado um produto de extensão, correspondendo ao sítio de início de transcrição em uma citosina localizada 35 bases a montante do códon de início de tradução (ATG) na linhagem J1a12, que não foi observado na linhagem rpoN, mostrando que a transcrição deste gene é iniciada em um promotor dependente de σ^{N} (Figura 28A). Este início de transcrição permite o posicionamento perfeito dos elementos conservados -12 GC e -24 GG, típicos de um canônico promotor dependente de σ^{N} e confirmam experimentalmente a predição *in silico* de um promotor σ^{N} para este gene (Tabela 9). Analisando com mais detalhe a região promotora de glnA foi possível reconhecer um provável sítio de ligação para proteína IHF e duas prováveis següências de ligação para o ativador

de σ^N NtrC de *Escherichia coli* (Craig e Nash, 1984; Reitzer e Magasanik, 1986) (Figura 28B).

Figura 28: Mapeamento do início de transcrição do gene *glnA* (XF1842) de *X. fastidiosa.* (A). O início de transcrição foi mapeado por ensaio de extensão de oligonucleotídeo. RNA (50 μg) extraído da linhagem selvagem J1a12 e do mutante *rpoN* foi hibridizado com oligonucleotídeo marcado com ³²P e o oligonucleotídeo foi estendido com transcriptase reversa. Os produtos de extensão foi analisado em gel de poliacrilamida junto com reações de seqüência de DNA do bacteriófago M13. Seta indica o início de transcrição. (B). Seqüência promotora do gene *glnA*. A seta indica o oligonucleotídeo utilizado no ensaio de extensão de oligonucleotídeo. O início de transcrição e as seqüências -12 /-24 estão destacadas em vermelho (nucleotídeos em verde são variações do consenso). Seqüência em azul (codon de início de tradução em negrito) marca o início da ORF reanotada. Seqüências sublinhadas e tracejadas indicam prováveis sítios de ligação de IHF e NtrC, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

O seqüenciamento do genoma completo da linhagem de citros 9a5c de *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) impulsionou tremendamente a pesquisa sobre uma bactéria até então pouco estudada. Os dados de seqüência revelaram um genoma reduzido: um cromossomo circular com 2,679305 bp e dois plasmídeos, o megaplasmídeo pXF51 com 51,158 bp e o miniplasmídeo pXF1.3 com 1,285 b. O restrito arsenal de ataque de *X. fastidosa* correlaciona-se com sua biologia. A especialização em colonizar o xilema de suas plantas hospedeiras e a estrita dependência de insetos vetores para transmissão planta-planta provavelmente foram pressões evolutivas que ajudam a explicar a possível redução no tamanho do genoma deste fitopatógeno. Por outro lado, a aquisição de genes envolvidos em adesão, alguns deles somente encontrados em patógenos de animais, pode ter contribuído para garantir adesão aos tecidos do inseto vetor e aos elementos do xilema, um ambiente caracterizado pelo fluxo ascendente da seiva bruta (Simpson *et al.*, 2000; Keen *et al.*, 2000).

De forma surpreendente, não foram encontrados genes *hrp* e *avr* que desempenham papel crucial nos mecanismos de patogenicidade em bactérias patogênicas de plantas (Simpson *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2000; Dow e Daniels, 2000; Keen *et al.*, 2000). Fitopatógenos dos gêneros *Pseudomonas, Xanthomonas, Ralstonia* e *Erwinia*, por exemplo, injetam proteínas efetoras de virulência (produtos dos genes *avr*) diretamente nas células da planta hospedeira via sistema de secreção do tipo III. Os genes que codificam esta maquinaria de secreção são ditos *hrp* (sigla em inglês para <u>hypersensitive response and pathogenicity</u>), pois são necessários para patogenicidade em plantas hospedeiras e para eliciar a resposta de hipersensibilidade, uma rápida e localizada morte celular programada, em plantas não hospedeiras (Alfano e Collmer, 2004).

Esta correlação entre multiplicidade de estilos de vida e complexidade do genoma também tem sido estendida para genes associados a funções regulatórias. Um grande repertório de genes envolvidos em funções regulatórias é comumente encontrado em bactérias de vida livre, que necessitam responder a flutuações de uma ampla variedade de fatores ambientais, enquanto um menor número é encontrado em bactérias restritas a nichos pouco variáveis (Cases *et al.*, 2003). De fato, *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, uma bactéria capaz de colonizar diversos

tecidos da planta, possui 296 genes envolvidos em funções regulatórias (7,6% do número de genes do genoma), quatro vezes mais do que *X. fastidiosa* (77 genes, 4.2% do genoma), uma bactéria limitada ao xilema (Moreira *et al.*, 2004). Neste sentido, não é surpreendente que *X. fastidiosa* possua apenas quatro fatores sigma em seu genoma (σ^{70} , σ^{32} , $\sigma^{N} e \sigma^{E}$), um número relativamente pequeno se comparado a outras bactérias (7 em *E. coli*, 19 em *Bacillus subtilis*, 13 em *Mycobacterium tuberculosis*). Excetuando-se o fator sigma primário σ^{70} , que deve ser responsável pela transcrição da maioria dos genes da célula, os demais fatores sigma a provavelmente contribuem para reprogramação da expressão gênica por direcionar a RNA polimerase para transcrição de conjuntos de genes específicos em resposta a estresses aos quais *X. fastidiosa* é submetida.

Embora os dados de seqüência tenham lançado luz sobre vários aspectos da biologia e patogenicidade de Xylella fastidiosa, o següenciamento de um genoma é apenas o ponto de partida que deve impulsionar estudos pós-genômicos subseqüentes. Classicamente, a determinação do conjunto de genes regulados pelos diferentes fatores sigma foi baseada principalmente na análise do fenótipo de linhagens mutantes e na verificação da ausência de expressão de genes candidatos nestes mutantes. O grande número de genomas bacterianos completamente següenciados tem permitido a transição desta fase de análise gene a gene para uma escala de análise global. Assim, comparação de padrões de expressão gênica por microarranjos de DNA e de proteínas por géis bidimensionais associados à espectrometria de massa entre linhagens selvagens e linhagens mutantes ou superexpressando os fatores sigma tem permitido a identificação de vários genes regulados por estes fatores (Gertz et al., 2000; Asai et al., 2003; Rhodius e LaRossa, 2003). A presença de seqüências conservadas na região promotora dos genes é uma evidência de que a regulação pelo fator sigma está ocorrendo de forma direta. A busca de tais seqüências, através de algoritmos computacionais, e subseqüente validação experimental tem sido uma abordagem freqüente atualmente (Cases et al., 2003; Studholme, 2002; Dombrecht et al., 2002; Rhodius et al., 2006).

Como praticamente não existiam ferramentas genéticas para *X. fastidiosa*, entender a função dos fatores sigma e identificar genes por eles regulados nesta bactéria pressupunha o desenvolvimento e o uso de metodologias ainda incipientes. Infelizmente os dois vetores construídos para expressar elevados níveis das proteínas σ^{32} , $\sigma^{N} e \sigma^{E}$ em *X. fastidiosa* não funcionaram como esperado. Os vetores

vazios transformaram X. fastidiosa com sucesso, mas a presença dos fatores sigma resultou em construções incapazes de transformar a bactéria, indicando um possível efeito tóxico da super-expressão dos sigma para X. fastidiosa. Esta abordagem de comparação do perfil transcricional da linhagem selvagem com uma linhagem superexpressando o sigma tem sido bastante utilizada, pois em muitos casos mostrou-se mais informativa do que a comparação em relação a linhagens mutantes, já que elevados níveis do fator sigma acarreta, muitas vezes, em aumento da expressão da maioria dos genes do regulon (Rhodius e LaRossa, 2003). A utilização desta estratégia permitiu a identificação de vários membros adicionais dos regulons σ^{E} (Rhodius *et al.*, 2006) e σ^{32} (Zhao *et al.*, 2005) em *E. coli* e a identificação de genes regulados pelo fator sigma ECF SigL em *M. tuberculosis* (Hahn et al., 2005), por exemplo. Em todos estes casos a elevação dos níveis dos fatores sigma foi feita de forma bastante controlada, a partir de promotores estritamente regulados para evitar o efeito deletério que a elevada quantidade de um fator sigma pode acarretar na célula. A construção dos dois vetores de expressão para X. fastidiosa com base no plasmídeo endógeno pXF1.3, que provavelmente está presente em múltiplas cópias nesta bactéria, e o pouco conhecimento a respeito de promotores regulados em X. fastidiosa, foram fatores que contribuíram para o malogro desta estratégia.

Quanto a técnica de mutagênese, inicialmente foi proposta a obtenção de mutantes para os três fatores sigma alternativos de X. fastidiosa, por recombinação homóloga direta, utilizando vetor híbrido replicativo baseado no miniplasmídeo pFX1.3, um sistema utilizado com sucesso em nosso laboratório para interromper o gene xpsD (da Silva Neto et al., 2002). No entanto, optou-se pela utilização do sistema baseado em vetores oriC que também mostrou ser eficiente para obter mutantes em linhagens de citros de Xylella fastidiosa (Gaurivaud et al., 2002). Esta opção pelo vetor oriC levou em consideração o fato de que este vetor deve ser cópia única na célula, enquanto o vetor baseado no pXF1.3 provavelmente tem muitas cópias. Assim, a integração das construções nos genes dos fatores sigmas ocorreria mais rapidamente em um vetor cópia única do que em um vetor multicópia. No entanto, o vetor oriC possui uma região com identidade com o cromossomo, além do gene alvo clonado no vetor, podendo integrar na origem de replicação do cromossomo. A presença de uma origem de replicação é necessária porque várias tentativas de utilização de vetores suicidas em linhagens de citros de X. fastidiosa não tiveram sucesso.

Utilizando esta estratégia foram geradas linhagens mutantes para os fatores σ^{E} e σ^{N} , mas não para o fator σ^{32} de *Xylella fastidiosa*. A integração das construções contendo fragmentos internos de cada um dos três fatores sigma alternativos de X. fastidiosa foi detectada após poucas passagens para o gene rpoE, demorou várias passagens para o gene rpoN e não foi detectada para o gene rpoH. Na linhagem J1a12 de Xylella fastidiosa foram utilizados fragmentos internos de diferentes tamanhos do gene bga, clonados em um vetor oriC para obtenção de mutantes por recombinação homóloga direta. O que se observou foi integração no gene endógeno bga guando o fragmento clonado deste gene era igual ou maior gue o fragmento oriC (Gaurivaud et al., 2002). No entanto, esta relação entre tamanho do inserto e integração não foi direta no caso dos fatores sigma, pois a construção que tinha a menor região de homologia – o vetor pUCoriCrpoE450 – foi a que integrou mais facilmente no gene rpoE. Isto demonstra que outros fatores também são importantes. Talvez o mais relevante deles seja a função do gene do qual se pretende obter a linhagem mutante. Caso o gene seja essencial para a sobrevivência da bactéria só é possível a obtenção de mutantes condicionais, fornecendo uma cópia que possa ser "desligada" na condição desejada. No caso do rpoH são poucas as bactérias nas quais se tentou gerar mutantes para este gene. Em *E. coli* mutantes nulos de σ^{32} só foram obtidos quando a seleção para a segunda recombinação foi feita a 15 °C e os mutantes obtidos perdem totalmente a

viabilidade em temperaturas acima de 20 °C (Zhou *et al.*, 1988). Com relação aos fatores sigma ECFs e ao fator σ^{N} foram obtidos mutantes nulos na grande maioria das bactérias, com exceção do fator σ^{E} de *E. coli* (De las Peñas *et al.*, 1997) e do fator σ^{N} de *Myxococcus xanthus* (Keseler e Kaiser, 1997), que são essenciais.

Como a linhagem patogênica 9a5c que teve seu genoma seqüenciado mostrou-se refratária à manipulação genética (Monteiro *et al.*, 2001b; da Silva Neto *et al.*, 2002), foi escolhida a linhagem J1a12 para mutagênese dos fatores sigma. Inicialmente isolada de laranjeiras com sintomas de clorose variegada de citros, esta linhagem mostrou-se adequada para transformação (Monteiro *et al.*, 2001b) e para geração de mutantes (da Silva Neto *et al.*, 2002; Gaurivaud *et al.*, 2002). Posteriormente, verificou-se que a linhagem J1a12 não era patogênica, pois mostrou-se incapaz de provocar sintomas em citros e em tabaco (Koide *et al.*, 2004a).

Uma comparação genômica entre as linhagens 9a5c e J1a12, feita por microarranjos de DNA, revelou que os genomas destas duas linhagens são bastante parecidos. Apenas 14 genes da linhagem 9a5c mostraram-se ausentes ou com seqüência altamente divergente na linhagem J1a12 e foi proposto que estas diferenças genéticas poderiam explicar, pelo menos em parte, o fenótipo menos agregativo e a baixa virulência da linhagem J1a12 (Koide *et al.*, 2004a). A grande similaridade entre estas duas linhagens permitiu a utilização dos dados da seqüência do genoma e dos microarranjos de DNA da linhagem 9a5c para estudos de expressão gênica na linhagem J1a12. Assim, a utilização de uma linhagem não patogênica no presente trabalho impossibilitou a definição do papel dos fatores sigma na patogenicidade de *X. fastidiosa*, mas permitiu desvendar vários mecanismos regulatórios nesta bactéria. A alta conservação de seqüências entre as linhagens de *X. fastidiosa*, embora com rearranjos cromossômicos, nos leva a crer que os mecanismos regulatórios sejam conservados (van Sluys *et al.*, 2003; Bhattacharyya *et al.*, 2002a).

Como nenhuma das ferramentas propostas para estudar a função dos fatores sigma de *X. fastidiosa* (obtenção de linhagens mutantes ou de linhagens expressando elevados níveis do sigma e obtenção de anticorpos) foi obtida para o fator σ^{32} , a despeito de numerosas tentativas, não foi possível caracterizar a função deste fator sigma neste trabalho. No entanto, em um trabalho realizado concomitantemente a este foi determinado o estimulon de choque térmico de *X. fastidiosa* e, dentre os muitos genes diferencialmente expressos, vários genes característicos da resposta ao choque térmico de *E. coli* e outras bactérias foram induzidos. A determinação do sítio de início de transcrição de alguns destes genes permitiu encontrar promotores com uma seqüência consenso semelhante ao consenso reconhecido pelo σ^{32} de *E. coli*, indicando que, em *X. fastidiosa*, como na maioria das bactérias, este fator sigma está envolvido sobretudo na transcrição de genes cujos produtos protegem a célula do acúmulo de proteínas desnaturadas no citoplasma, geradas pelo calor (Koide *et al.*, 2006).

5.1 PAPEL DO FATOR σ^E DE *Xylella fastidiosa*

A caracterização fenotípica do mutante *rpoE* indicou que σ^{E} de *X. fastidiosa* é importante para resposta a estresse por etanol e choque térmico, mas não parece

ter papel importante na resposta a estresse osmótico e oxidativo. A sensibilidade de mutantes de sigma ECFs a alta temperatura, estresse oxidativo, etanol, SDS, fase estacionária e envolvimento em patogenicidade tem sido verificada para várias bactérias (Bashyam e Hasnain, 2004; Rowley *et al.*, 2006). Em *E. coli* σ^{E} é a principal via de resposta ao choque térmico extremo e linhagens mutantes para *rpoE* que apresentavam extrema sensibilidade a alta temperatura demonstraram possuir mutações compensatórias (Hiratsu *et al.*, 1995), pois foi verificado posteriormente que σ^{E} é essencial para *E. coli*, mesmo em condições normais de crescimento (De las Peñas *et al.*, 1997). Mutantes de *rpoE* de *Vibrio cholerae* são sensíveis apenas a etanol, não demonstrando sensibilidade a alta temperatura (43 °C), estresse oxidativo e osmótico (Kovacikova e Skorupski, 2002). A complementação do mutante *rpoE* em *trans*, o primeiro mutante a ter seu fenótipo complementado em *X. fastidiosa*, comprova que a susceptibilidade a choque térmico foi devido realmente à ausência do fator σ^{E} na linhagem mutante, e não devido à mutações secundárias em outros genes.

Considerando que o mutante *rpoE* mostrou susceptibilidade a choque térmico e etanol, dois estresses que geram o acúmulo de proteínas desnaturadas na célula, e que σ^{32} parece mediar a resposta a choque térmico citoplasmática, foram realizadas análises por microarranjo de DNA para definir o regulon σ^{E} de *X. fastidiosa* em temperatura normal de cultivo e em resposta a choque térmico. A comparação do perfil de expressão das linhagens J1a12 e *rpoE* em situação sem estresse quase não revelou genes diferencialmente expressos, enquanto a comparação do perfil de expressão das mesmas linhagens submetidas a choque térmico revelou pelo menos 21 genes com expressão reduzida no mutante em relação à linhagem selvagem. Dentre estes genes, alguns codificam para fatores que auxiliam no dobramento ou degradação de proteínas no periplasma.

Em *E. coli* o regulon σ^{E} tem sido alvo de inúmeros estudos. Os primeiros membros deste regulon identificados foram o próprio operon σ^{E} , a protease DegP e o fator sigma de choque térmico σ^{32} . Posteriormente, foram identificados 20 promotores que tiveram sua expressão dependente de σ^{E} , incluindo genes para quatro *chaperones* envolvidas no dobramento de proteínas do envelope (*dsbC, fkpA, skP* e *surA*), proteases periplasmáticas (*htrA* e *yaeL*), fatores transcricionais (*rpoE, rpoH* e *rpoD*) e vários genes envolvidos na síntese do envelope (Dartigalongue *et al.,*

2001). Recentemente, um estudo comparando uma linhagem super-expressando σ^{E} com a linhagem selvagem por microarranjo de DNA, associado a buscas de consenso por bioinformática, confirmou e expandiu o regulon σ^{E} de *E. coli* para 49 promotores (Rhodius *et al.*, 2006). Assim como no regulon σ^{E} de *E. coli*, foi observada no regulon σ^{E} de *X. fastidosa* a presença de genes codificando peptidilprolil *cis-trans* isomerases (XF0644 e XF1212), prováveis peptidases (XF0167 e XF2594) e a protease XF2241, que pode ser a ortóloga de HtrA. A principal diferença observada foi a ausência de genes envolvidos na síntese do envelope e a a ausência do gene *rpoH* no regulon σ^{E} de *X. fastidosa*.

Em *P. aeruginosa* um estudo combinando busca por consenso no genoma através de algoritmos computacionais e mapeamento da região 5['] do mRNA em linhagens selvagem e mutante, identificou 10 promotores dependentes do sigma AlgU, o fator sigma ECF mais estudado de *P. aeruginosa,* envolvido na conversão ao fenótipo mucóide virulento (Firoved *et al.,* 2002). Os casos de bactérias com múltiplos fatores sigma ECFs melhor estudados são *Bacillus subtilis, Streptomyces coelicolor* e *Mycobacterium tuberculosis,* onde os regulons de vários fatores sigma ECFs têm sido determinados em escala global. A estratégia mais utilizada é a análise do perfil transcricional de linhagens selvagens em relação a linhagens mutantes, especialmente em condições que ativem o regulon em questão (ou induzindo o sigma artificialmente por super-expressão ou repressão do anti-sigma) combinada com métodos de busca por consensos, através de algoritmos computacionais, para identificação de seqüências promotoras (Helmann, 2002).

A determinação do sítio de início de transcrição de alguns dos genes do regulon σ^{E} de *X. fastidiosa* permitiu encontrar elementos de seqüência conservados, reconhecidos por fatores sigma ECFs em outras bactérias, como σ^{E} de *E. coli* (Rhodius *et al.,* 2006) e AlgU de *P. aeruginosa* (Firoved *et al.,* 2002). Tem sido observado que bactérias com múltiplos sigma ECFs, caso de *P. aeruginosa*, têm seqüências consenso menos variáveis para evitar redundância no reconhecimento dos promotores entre eles, enquanto bactérias com poucos ECFs, caso de *X. fastidiosa* e *E. coli*, suportam maior variação na seqüência promotora dos genes que estes fatores sigma regulam (Helmann, 2002).

Foi demonstrado que vários fatores sigma ECFs são induzidos por estresses ambientais em nível transcricional: *sigV* de *Enterococcus faecalis*, por carência de

glicose, choque de calor e SDS (Benachour *et al.*, 2005); *rpoE* de *Salmonella typhimurium*, por choque frio, choque de calor, estresse osmótico e entrada na fase estacionária (Miticka *et al.*, 2003); e *algT* de *Pseudomonas syringae*, por choque de calor e estresses osmótico e oxidativo (Keith e Bender, 1999). Nestes três exemplos, o aumento da expressão em resposta a estresse é dependente de um promotor auto-regulado. Provavelmente, isto não ocorre para o gene *rpoE* de *X. fastidiosa*, pois os níveis do mRNA de *rpoE* praticamente não foram induzidos pelos estresses testados e não diminuíram na linhagem mutante *rpoE* quando comparado a linhagem J1a12, demonstrando que σ^{E} não é necessário para sua própria transcrição.

Um gene codificando um provável fator anti-sigma (rseA) está localizado a jusante do gene rpoE no genoma de X. fastidiosa e é co-transcrito com XF2241, que codifica uma protease da família HtrA, ortóloga de MucD. Enguanto o gene rpoE não mostrou indução por choque térmico, rseA e XF2241 foram induzidos por choque térmico de modo dependente de σ^{E} , a partir de um promotor interno ao operon. Uma organização genômica similar é encontrada em Xanthomonas sp., onde os genes XCC1267/XCC1268/XCC1269 codificam um fator sigma ECF, um possível fator antisigma e um ortólogo de MucD, respectivamente. Em outras bactérias, tais como Enterobactérias e Pseudomonas, pode haver um ou dois genes a jusante de rseA (chamados rseB/mucB e rseC/mucC), que codificam proteínas acessórias na regulação da atividade de σ^{E} (Missiakas *et al.*, 1997; Schurr *et al.*, 1996). Não há ortólogos de rseB e rseC no genoma de X. fastidiosa, o que sugere que a atividade de σ^{E} deve ser regulada somente por RseA nesta bactéria. Como o aumento na atividade de σ^E em resposta ao choque térmico não é resultante de um aumento nos níveis do mRNA ou da proteína, propomos que σ^{E} é regulado em nível de atividade pela ação do provável anti-sigma, codificado pelo gene XF2240.

A Figura 29 apresenta um possível modelo de regulação para σ^{E} de *Xylella*, que se assemelha a modelos gerais de regulação de sigma ECFs de outras bactérias em alguns aspectos, mas difere em outros. No modelo é proposto que os genes *rpoE* (XF2239), *rseA* (XF2240) e XF2241 são co-transcritos a temperatura normal a partir de um promotor σ^{70} localizado no início do operon, gerando um nível basal e permanente de σ^{E} e anti-sigma na célula. Durante o choque térmico a proteína σ^{E} seria liberada da membrana, por inativação do anti-sigma, ficando disponível para associar-se ao cerne da RNA polimerase e transcrever os genes do regulon σ^{E} , incluindo fatores de degradação e dobramento de proteínas desnaturadas pelo calor e o gene do anti-sigma, a partir do promotor dependente de σ^{E} , interno ao operon. Isto resultaria em altos níveis de RseA na célula e esta proteína seqüestraria o σ^{E} na membrana, mantendo-o na forma inativa ao término da resposta.



Figura 29: Um possível modelo de regulação para o fator sigma ECF σ^{E} de *Xylella fastidiosa.* As ORFs XF2239 (*rpoE*), XF2240 (*rseA*) e XF2241 codificam para σ^{E} , seu provável anti-sigma e uma protease periplasmática, respectivamente. Em situação normal os três genes são co-transcritos, garantindo a presença do sigma na célula na forma inativa, seqüestrado na membrana pelo fator anti-sigma. Um sinal, no caso choque térmico, leva a liberação do sigma que associa-se ao cerne da RNA polimerase (RNAP), levando a transcrição de genes do regulon σ^{E} , incluindo o anti-sigma e a protease periplasmática. O gene que codifica para σ^{E} não é autoregulado em resposta a choque térmico (provavelmente é transcrito a partir de um promotor sigma 70, $P\sigma^{70}$), mas σ^{E} regula positivamente o anti-sigma em resposta a choque térmico a partir de um promotor sigma 70, $P\sigma^{70}$), mas σ^{E} regula positivamente o anti-sigma em resposta a choque térmico a partir de um promotor sigma 70, $P\sigma^{70}$), mas σ^{E} regula positivamente o anti-sigma em resposta a choque térmico a partir de um promotor sigma 70, $P\sigma^{70}$), mas σ^{E} regula positivamente o anti-sigma em resposta a choque térmico a partir de um promotor interno ao operon ($P\sigma^{E}$). ME: membrana externa; P: periplasma; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma.

Este tipo de regulação observado em *X. fastidiosa* apresenta diferenças em relação ao modelo mais comum de regulação para sigma ECFs. A grande maioria dos ECFs formam operons sigma/anti-sigma autoregulados em resposta a estresse, um mecanismo eficiente de amplificação e subseqüente desligamento da resposta (Helmann, 2002). Uma exceção importante a este tipo de regulação são o subgrupo de sigma ECFs de resposta a carência de ferro, que não são autoregulados (Braun *et al.,* 2003). Argumenta-se que por regular um conjunto reduzido de genes a

amplificação da resposta por autoregulação seria desnecessária. Entretanto, o fator σ^{E} de *X. fastidiosa* regula um grande número de genes e a transcrição de *rpoE* é até diminuída quando σ^{E} está ativado (choque térmico), enquanto a transcrição de *rseA* é bastante aumentada. Uma hipótese para explicar esta diferença de regulação poderia ser a hipótese de que uma maior estabilidade da proteína σ^{E} de *X. fastidiosa* substituiria a necessidade de um aumento na transcrição do gene *rpoE* por autoregulação, como observado em outras bactérias, já que a transcrição do gene *rpoE* diminui durante o choque térmico, mas os níveis da proteína σ^{E} não se alteram, indicando um controle pós-transcricional.

Para verificar se a estabilidade da proteína σ^{E} se altera em resposta a choque térmico, os níveis de σ^{E} foram analisados em diferentes tempos após a adição de antibióticos que param a síntese protéica (dados não mostrados). Esperava-se que nos tempos subseqüentes a adição dos antibióticos os níveis de σ^{E} diminuíssem gradativamente pelo fato da proteína degradada pelas proteases da célula não serem repostas devido à parada da tradução. No entanto, inesperadamente os níveis de σ^{E} não se alteraram utilizando diferentes antibióticos, em concentrações bem superiores as necessárias para inibir o crescimento de *X. fastidiosa*. Assim, não foi possível confirmar nem refutar a hipótese de que a proteína σ^{E} teria sua estabilidade aumentada durante o choque térmico.

Recentemente, foi descrito que o sigma ECF de carência a ferro HasI de *Serratia marcescens* não é autoregulado, mas regula positivamente o anti-sigma HasS (Biville *et al.*, 2004), um mecanismo bastante semelhante ao encontrado para σ^{E} de *Xylella fastidiosa*. Como foi o primeiro sigma ECF encontrado com este tipo de regulação, os autores argumentam que poderia ser uma característica restrita aos ECFs de carência a ferro. Os dados deste trabalho e a descoberta recente de um promotor dependente de σ^{E} para o anti-sigma de *E. coli* (Rhodius *et al.*, 2006) demonstram que este mecanismo regulatório é mais amplo, incluindo sigma ECFs de resposta a estresse, embora em *E. coli* σ^{E} seja também autoregulado.

O mecanismo de ativação do σ^{E} de *X. fastidiosa* talvez possa ocorrer de modo semelhante à regulação do fator σ^{E} de *E. coli* em resposta a presença de porinas desdobradas no periplasma. Foi demonstrado que a via de transdução deste sinal ocorre por proteólise seqüencial do anti-sigma RseA pelas proteases YaeL e DegS, liberando o σ^{E} para transcrição dos genes de seu regulon (Ades, 2004; Alba e

Gorss, 2004). Além do anti-sigma já discutido, *X. fastidiosa* possui ortólogos para as proteases DegS e YaeL. O papel de DegS, perceber o estresse e realizar o primeiro evento de proteólise do anti-sigma, poderia ser realizado pelo produto da ORF XF0285 ou da ORF XF2241, as duas proteases da família HtrA de *Xylella*. Estes dois genes foram induzidos por choque térmico, embora apenas a indução de XF2241 seja dependente de σ^{E} . A indução de XF0285 provavelmente é dependente de σ^{32} , o outro fator sigma de choque térmico, pois verificamos um consenso para σ^{32} na região promotora deste gene. A ORF XF1047 apresenta um domínio de peptidase da família M50, dois domínios PDZ e três domínios transmembrana, tendo alta similaridade com a protease YaeL de *E. coli*, que realiza a proteólise intramembrana do anti-sigma, liberando o sigma da membrana.

5.2 PAPEL DO FATOR σ^{N} DE Xylella fastidiosa

Para identificar genes regulados pelo fator σ^N de *Xylella fastidiosa*, inicialmente foi feita a comparação do perfil de expressão das linhagens J1a12 e *rpoN* em meio rico PWG. A comparação nestas condições revelou 38 genes diferencialmente expressos, dos quais somente 7 genes tiveram expressão reduzida, enquanto 31 genes tiveram expressão aumentada no mutante em relação à linhagem selvagem. Como os fatores sigma são primariamente ativadores de transcrição, genes com expressão aumentada no mutante são provavelmente regulados indiretamente (menor expressão de um repressor, por exemplo) ou pleiotropicamente. No entanto, já foi demonstrado que σ^N pode atuar diretamente como regulador negativo, por manter-se ligado na forma de complexo fechado a promotores transcritos por outros fatores sigma, um mecanismo conhecido como antagonismo de fator sigma (Boucher *et al.*, 2000). Assim, alguns dos genes com expressão aumentada no mutante *rpoN* poderiam ser diretamente reprimidos por σ^N .

Por outro lado, os genes que tiveram expressão reduzida no mutante *rpoN* podem ser regulados direta ou indiretamente por σ^N . Uma evidência de que estes genes são diretamente regulados por σ^N é a presença de potenciais sítios de ligação de σ^N em suas regiões promotoras. Dos 7 genes genes que tiveram expressão reduzida no mutante *rpoN*, foi encontrado um sítio de ligação de σ^N somente na região promotora do gene *pilA* (XF2542), que codica a subunidade estrutural da fímbria tipo IV. Provavelmente σ^N de *X. fastidiosa* regula diretamente a transcrição

de mais de um gene, mas nestas condições testadas os demais genes-alvo de σ^N devem apresentar baixa expressão na linhagem selvagem, de modo que uma redução na expressão destes genes na linhagem mutante *rpoN* não foi detectada. De fato, a iniciação da transcrição pelo fator σ^N requer a cooperação com ativadores de σ^N , denominados proteínas ligadoras de *enhancer* (EBPs), e *X. fastidiosa* possui duas EBPs (XF2545 e XF1848) codificadas em seu genoma. Ambas as proteínas preditas contêm um domínio regulador de resposta e os genes parecem ser co-transcritos com genes codificando histidina quinases sensoras (XF2546 e XF1849), sugerindo que estas EBPs são ativadas por fosforilação.

O lócus XF2545/XF2546 codifica proteínas que são bastante similares ao sistema de dois componentes PilR/PilS que regula a produção de pilina em P. aeruginosa (Ishimoto e Lory 1992) e localiza-se próximo ao gene pilA (XF2542) no genoma de X. fastidiosa. A inserção de um transposon no ortólogo de PilR da linhagem Temecula de X. fastidiosa causou a perda da fímbria tipo IV (Li et al., 2007). O segundo lócus (XF1848/XF1849) codifica proteínas que são bastante similares ao sistema de dois componentes NtrB/NtrC que controla assimilação de nitrogênio em batérias entéricas (Reitzer e Schneider 2001) e localiza-se próximo à genes envolvidos em metabolismo de nitrogênio no genoma de X. fastidiosa. Como o mais importante controle da expressão dos genes regulados por o^N é a modulação da atividade das EBPs (Shingler, 1996), provavelmente a biogênese de fímbrias e o metabolismo de nitrogênio são as duas principais funções fisiológicas controlados por σ^N em X. fastidiosa. Nas condições experimentais utilizadas para os experimentos iniciais de microarranjo de DNA, somente PilR deve estar ativo, permitindo a expressão de pilA, enquanto NtrC não deve estar ativo devido à alta concentração de nitrogênio presente no meio de cultura PWG (os experimentos em condições de carência de nitrogênio serão discutidos abaixo). Assim, os dados desta primeira análise de microarranjo de DNA indicaram que σ^{N} regula positivamente o gene que codifica a pilina da fímbria tipo IV e negativamente genes da maquinaria de montagem da fímbria tipo I.

Em *Pseudomonas aeruginosa* o gene estrutural para fímbria do tipo IV é transcrito por σ^N e mutantes para o gene *rpoN* não apresentam fímbrias quando analisados por microscopia eletrônica (Totten *et al.*, 1990). Nesta bactéria pelo menos 40 genes foram identificados como importantes para montagem, função e regulação da fímbria do tipo IV (Mattick *et al.*, 1996). Este tipo de fímbria está

presente na região polar de uma grande variedade de bactérias patogênicas, sendo importante para adesão, agregação, formação de biofilme, patogênese e *twitching motility*, um tipo de locomoção independente de flagelo (Mattick, 2002).

Em artigo recente, foi demonstrada para a linhagem Temecula de *Xylella fastidiosa* a presença de duas classes de fímbrias na célula, fímbria tipo I curta e fímbria tipo IV longa (Meng *et al.*, 2005). Estes autores demonstraram que a fímbria tipo IV media *twitching motility*, enquanto a fímbria tipo I é importante para formação de biofilme. Linhagens mutantes de vários genes associados à fímbria tipo IV, incluindo *pilB, pilQ, fimT, pilX, pilY1, pilO* e *pilR*, foram deficientes em fímbria tipo IV, não exibiram fenótipo de *twitching motility*, mostraram aumentada formação de biofilme e grandes agregados célula-célula. Por outro lado, o mutante *fimA*, deficiente em fímbria tipo I, mostrou reduzida formação de biofilme e exibiu maior *twitching motility* (Meng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

Este trabalho propõe que X. fastidiosa pode regular diferencialmente genes destas duas classes de fímbrias através do fator sigma alternativo σ^{N} . Os resultados dos experimentos de microarranjos de DNA e gRT-PCR claramente demonstram que σ^{N} regula positivamente a transcrição de *pilA* (XF2542), que codifica a proteína estrutural da fímbria tipo IV, enquanto regula negativamente a transcrição do operon que codifica proteínas envolvidas na montagem da fímbria tipo I (XF0080-81-82-83), incluindo *fimA* (XF0083), que codifica a proteína estrutural. O mutante *rpoN* apresentou aumentada formação de biofilme e grandes agregados de células, o que está de acordo com a reduzida expressão de *pilA* e a aumentada expressão de *fimA* nesta linhagem, e de acordo com os fenótipos para mutantes de fímbrias tipo I e tipo IV, descritos acima. Recentemente, foi demonstrado que mutantes da linhagem J1a12 de X. fastidiosa para os genes gumB e gumF, dois genes do operon de biossíntese da goma exopolissacarídica, têm reduzida capacidade de formar biofilme em meio BCYE, embora esta diferença não seja observada em meio PW (Souza et al., 2006). Também tem sido verificado que a adição do fluído do xilema em culturas de X. fastidiosa estimula a formação de biofilme e a agregação das células (Leite et al., 2004; Andersen et al., 2007).

Entretanto, o mutante *rpoN* não mostrou redução em *twitching motility* quando comparado a linhagem selvagem J1a12. Este efeito pode ser devido ao papel compensatório dos outros parálogos de *pilA* que não são regulados por σ^{N} . De fato, somente XF2542 mostrou-se fortemente reprimido no mutante *rpoN*, enquanto

expressão dos outros prováveis genes da pilina tipo IV foi pouco reduzida ou até aumentada (como XF2539) no mutante. Análise da expressão das fímbrias por microscopia eletrônica de transmissão não mostrou diferenças significativas entre as linhagens J1a12 e *rpoN*, sugerindo que os outros parálogos de *pilA* são provavelmente expressos.

O genoma da linhagem 9a5c apresenta um grande número de genes associados à fímbria tipo IV (Simpson *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2004), incluindo seis cópias do gene *pilA*. Em outras bactérias que têm grande número de parálogos do gene da pilina, tais como, *Francisella tularenis*, que tem cinco cópias (Gil *et al.*, 2004), ou a linhagem Temecula de *X. fastidiosa*, que tem quatro cópias (Van Sluys *et al.*, 2003), a função de cada um destes parálogos ainda não foi estudada. Portanto, neste trabalho são fornecidas evidências de que *X. fastidiosa* pode expressar diferencialmente genes de duas classes de fímbrias sob controle de σ^N , influenciando, desta forma, importantes processos como formação de biofilme e agregação célula-célula.

O outro principal processo regulado por σ^{N} em X. fastidiosa provavelmente é a resposta à carência de nitrogênio. X. fastidiosa cresce exclusivamente no xilema, e embora a seiva bruta contenha uma diversidade de compostos como aminoácidos, ácidos orgânicos e íons inorgânicos, estes encontram-se em baixas concentrações (Andersen et al., 1995). Glutamina e asparagina são os principais aminoácidos encontrados no fluido do xilema das plantas (Lea et al., 2007), e por esta razão estes aminoácidos foram adicionados na composição de vários meios de cultura desenvolvidos para X. fastidiosa, incluindo os meios PW (Davis et al., 1981) e XDM₂ (Lemos et al., 2003) utilizados neste trabalho. A glutamina é a principal fonte de nitrogênio no xilema de videiras (Vitis vinifera) (Andersen et al., 2007), enquanto em citros (Citrus sinensis) predominam asparagina e glutamina, com menores quantidades de ácido aspártico, serina, arginina e ácido glutâmico (Purcino et al., 2007). Assim, X. fastidiosa deve enfrentar limitação de nitrogênio em seu habitat natural e deve ser capaz de utilizar aminoácidos como fonte de nitrogênio. Para entender como esta bactéria enfrenta a carência de nitrogênio, o perfil de expressão da linhagem selvagem J1a12, submetida à carência total de nitrogênio por 2, 8 e 12 horas foi analisado por microarranjo de DNA.

Esta análise revelou alteração na expressão de muitos genes, envolvidos em processos celulares diversos. Os tempos de carência de nitrogênio, escolhidos com

base na literatura, revelaram-se adequados, pois o número de genes diferencialmente expressos aumentou substancialmente de duas para oito horas e começou a declinar no ponto de doze horas, indicando que a série temporal abarcou uma ampla gama de genes com expressão alterada em resposta a carência de nitrogênio. Dentre os processos celulares afetados pela carência de nitrogênio em *X. fastidiosa* destacam-se: a reorganização da capacidade de transporte da célula, a alteração em vias metabólicas de síntese e degradação de moléculas; e repressão nas vias de metabolismo de carbono e geração de energia.

Pelo menos 20 genes codificando possíveis transportadores foram diferencialmente expressos, embora muitos deles tenham sido reprimidos e não induzidos. Em *E. coli* (Zimmer *et al.*, 2000) e *Corynebacterium glutamicum* (Silberbach *et al.*, 2005) a indução de sistemas de transporte é uma das principais respostas à carência de nitrogênio. Outra característica desta resposta em *E. coli* é a indução de genes de vias do catabolismo de compostos nitrogenados, como aminoácidos e aminoacúcares da parede celular (Zimmer *et al.*, 2000). Embora a expressão de alguns poucos genes envolvidos na degradação de proteínas e aminoácidos tenha sido afetada, houve uma mudança mais substancial na expressão de genes de biossíntese de aminoácidos, provavelmente como decorrência da transferência das células de um meio de cultura que tinha aminoácidos como fonte de nitrogênio para um meio sem qualquer fonte de nitrogênio.

As categorias funcionais que mostraram maior número de genes reprimidos foram o metabolismo intermediário central, o metabolismo energético de carbono e o metabolismo de proteínas, indicando que a carência de nitrogênio provocou uma redução na atividade geral das células. Na categoria metabolismo de proteínas houve a repressão da maioria dos genes típicos da resposta ao choque térmico, como *groeL, groeS, hspA, dnaJ, dnaK, grpE, clpB* e *mucD*, que codificam os principais sistemas de *chaperones* e proteases da célula. Quase todos estes genes estão entre aqueles que foram reprimidos em todos os pontos da série temporal. Outra resposta interessante observada foi a alteração na expressão de um grande número de genes (23 genes induzidos e 8 genes reprimidos) presentes no megaplasmídeo pXF51, sendo que vários destes genes codificam para proteínas do sistema de secreção do tipo IV, envolvido em conjugação bacteriana.

Em várias bactérias a limitação de nitrogênio provoca um aumento na transcrição dos genes glnA, que codifica a enzima glutamina sintetase (GS), e gltBD, que codifica as duas subunidades da enzima glutamato sintase (GOGAT), pois nesta situação a maior parte da assimilação de amônia ocorre pela via GS/GOGAT (Reitzer, 2003). Nas condições de carência de nitrogênio utilizadas em X. fastidiosa foi observado um aumento na transcrição dos genes gltBD, mas inesperadamente o gene glnA não teve sua expressão alterada em nenhum dos pontos da série temporal. O fato de glnA apresentar altos níveis de expressão já sob condições de crescimento em suficiência de nitrogênio, como revelado pela detecção de seu transcrito no ensaio de extensão de oligonucleotídeo com células cultivadas em meio PWG (Figura 28) poderia justificar a ausência de indução. Em C. glutamicum o gene glnA já apresenta elevada expressão em meio rico em nitrogênio e sofre apenas pequena indução em carência de nitrogênio (Silberbach et al., 2005). De qualquer modo, mesmo não sendo detectado nas análises de microarranjo de DNA, o gene glnA foi confirmado como membro do regulon σ^{N} em X. fastidiosa, pois foi encontrado um promotor dependente de σ^{N} e sítios de ligação de NtrC para este gene.

Além da definição do estimulon de carência de nitrogênio, foram identificados genes regulados em resposta a este estresse de modo dependente de σ^N em *X. fastidiosa*, pela comparação do perfil de expressão das linhagens J1a12 e *rpoN* mantidas por duas horas em carência de nitrogênio. A comparação nestas condições revelou 22 genes diferencialmente expressos, dos quais 7 genes tiveram expressão reduzida, enquanto 22 genes tiveram expressão aumentada no mutante em relação à linhagem selvagem. Dos sete genes positivamente regulados por σ^N , cinco foram induzidos nos experimentos da série temporal, indicando que estes genes provavelmente são induzidos por carência de nitrogênio de modo dependente de σ^N em *X. fastidiosa.*

Portanto, os experimentos em carência de nitrogênio permitiram identificar um grande número de genes diferencialmente expressos e alguns deles possivelmente devido ao envolvimento direto de σ^{N} . Um maior aprofundamento na análise destes dados e a validação do padrão de expressão de alguns genes certamente permitirá traçar um panorama bastante completo da resposta a este estresse em *X. fastidiosa*.

6 CONCLUSÕES

✓ A estratégia de mutagênese por recombinação homóloga direta baseada em vetor replicativo mostrou-se adequada para obtenção de linhagens mutantes em *X. fastidiosa*. Mutantes nulos foram obtidos para os genes *rpoE* (σ^E) e *rpoN* (σ^N), mas não foi obtido mutante para o gene *rpoH* (σ^{32}), sugerindo que este gene possa ser essencial em *X. fastidiosa*.

✓ O mutante *rpoE* mostrou-se sensível a etanol e a choque térmico e o fenótipo de sensibilidade a choque térmico foi complementado em *trans*, indicando o papel deste fator sigma na resposta a estresses que provocam a desnaturação de proteínas na célula.

✓ Dentre os genes identificados como membros do regulon σ^{E} , vários deles codificam para fatores de dobramento ou degradação de proteínas desnaturadas no periplasma (*chaperones* e proteases).

✓ Promotores induzidos por choque térmico de modo dependente de σ^{E} foram identificados e, a partir da determinação do início de transcrição de alguns genes, foi definido um consenso para σ^{E} de *X. fastidiosa*. Estes elementos conservados foram identificados a montante de vários genes regulados por σ^{E} , indicando que estes genes podem ser diretamente regulados por este fator sigma.

✓ A resposta a choque térmico mediada por σ^{E} provavelmente envolve aumento na atividade de σ^{E} pré-formado, pois os níveis da proteína e do mRNA deste fator sigma não aumentaram em resposta a este e a outros estresses. Diferentemente da maioria dos fatores sigma ECFs, o gene *rpoE* de *X. fastidiosa* não apresentou autoregulação, mas regulou positivamente o gene do anti-sigma em resposta a choque térmico, provavelmente como um mecanismo de desligamento da resposta.

✓ As duas principais funções definidas para o fator σ^N em *X. fastidiosa* foram a regulação de genes que codificam estruturas fimbriais e a regulação de genes de resposta a carência de nitrogênio.

✓ Os dados de expressão e os dados de caracterização fenotípica do mutante *rpoN* forneceram evidências de que *X. fastidiosa* pode expressar diferencialmente genes de duas classes de fímbria, pois o gene *pilA*, codificando a pilina da fímbria tipo IV, é positivamente regulado por σ^N , enquanto o operon codificando proteínas da

fímbria tipo I é regulado negativamente, explicando a maior formação de biofilme e auto-agregação no mutante *rpoN*.

✓ A carência de nitrogênio provocou alteração na expressão de um grande número de genes, envolvidos em funções celulares diversas. De modo geral, foi verificada a reorganização da capacidade de transporte da célula, a alteração em vias metabólicas de síntese e degradação de moléculas e a repressão nas vias de metabolismo de carbono e geração de energia. Alguns destes genes foram induzidos por carência de nitrogênio de modo dependente de σ^{N} .

REFERÊNCIAS

- ADES, S. E. Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Microbiol. v. 7, p. 157-162, 2004.
- ALBA, B. M.; GROSS, C. A. Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p.613-619, 2004.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annu. Rev. Phytopathol., v. 42, p. 385-414, 2004.
- ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B. V.; MIZELL, III R. F. Water-stress and nutrient solution mediated changes in water relations and amino acids, organic acids and sugars in xylem fluid of *Prunus salicina* and *Lagerstroemia indica*. J. Am. Soc. Horticult Sci., v.120, p. 36–42, 1995.
- ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B. V.; ODEN, S.; SHRINER, A.; LEITE, B. Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth, biofilm formation and aggregation of Xylella fastidiosa. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 274, p. 210-217, 2007.
- ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 65, p. 80– 105, 2001.
- ARSENE, F.; TOMOYASU, T.; BUKAU, B. The heat shock response of *Escherichia coli*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 55, p. 3-9, 2000.
- ASAI, K.; YAMAGUCHI, H.; KANG, C. M.; YOSHIDA, K. I.; FUJITA, Y.; SADAIE, Y. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* sigma factors of extracytoplasmic function family **FEMS Microbiol. Letters**, v. 220, p. 155-160, 2003.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAM, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). Short Protocols in Molecular Biology. 3nd ed. John Wiley Associates. 1992.
- BALL, C. A.; BRAZMA, A.; CAUSTON, H.; CHERVITZ, S.; EDGAR, R.; HINGAMP, P.; MATESE, J. C.; PARKINSON, H.; QUACKENBUSH, J.; RINGWALD, M.; SANSONE, S. A.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; TATENO, Y.; TAYLOR, R.; WHITE, J.; WINEGARDEN, N. Submission of microarray data to public repositories. **PIoS. Biol.**, v. 2, p. E317, 2004.
- BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORETT, E. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. Nucleic Acids Res., v. 27, p. 4305-4313 1999.
- BASHYAM, M. D.; HASNAIN, S. E. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. **Infect. Genet. Evol.**, v. 4, p. 301-308, 2004.

- BAULARD, A.; KREMER, L.; LOCHT, C. Efficient homologous recombination in fastgrowing and slow-growing mycobacteria. J. Bacteriol. v. 178, p. 3091-3098, 1996.
- BENACHOUR, A.; MULLER, C.; DABROWSKI-COTON, M.; LE BRETON, Y.; GIARD, J. C.; RINCE, A.; AUFFRAY, Y.; HARTKE, A. The *Enterococcus faecalis* sigV protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival following heat, acid, and ethanol treatments. J. Bacteriol., v. 187, p. 1022-1035, 2005.
- BHATTACHARYYA, A.; STILWAGEN, S.; IVANOVA, N.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.;
 LYKIDIS, A.; KAPATRAL, V.; ANDERSON, I.; LARSEN, N.; LOS, T.; REZNIK,
 G.; SELKOV, E. JR.; WALUNAS, T. L.; FEIL, H.; FEIL, W. S.; PURCELL, A.;
 LASSEZ, J. L.; HAWKINS, T. L.; HASELKORN, R.; OVERBEEK, R.; PREDKI,
 P. F.; KYRPIDES, N. C. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic Xylella fastidiosa strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 99(19), p. 12403-12408, 2002a.
- BHATTACHARYYA, A.; STILWAGEN, S.; REZNIK, G.; FEIL, H.; FEIL, W. S.; ANDERSON, I.; BERNAL, A.; D'SOUZA, M.; IVANOVA, N.; KAPATRAL, V.; LARSEN, N.; LOS, T.; LYKIDIS, A.; SELKOV, E. JR; WALUNAS, T. L.; PURCELL, A.; EDWARDS, R. A.; HAWKINS, T.; HASELKORN, R.; OVERBEEK, R.; KYRPIDES, N. C.; PREDKI, P. F. Draft Sequencing and Comparative Genomics of Xylella fastidiosa Strains Reveal Novel Biological Insights. Genome Res., v. 12(10), p. 1556-1563, 2002b.
- BIVILLE, F.; CWERMAN, H.; LETOFFE, S.; ROSSI, M. S.; DROUET, V.; GHIGO, J.
 M.; WANDERSMAN, C. Haemophore-mediated signalling in *Serratia marcescens*: a new mode of regulation for an extra cytoplasmic function (ECF) sigma factor involved in haem acquisition. Mol. Microbiol., v. 53, p. 1267-1277, 2004.
- BORUKHOV, S.; NUDLER, E. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 93-100, 2003.
- BOUCHER, J. C.; SCHURR, M. J.; DERETIC, V. Dual regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* and sigma factor antagonism. **Mol. Microbiol.**, v. 36, p. 341-351, 2000.
- BRAUN, V.; MAHREN, S.; OGIERMAN, M. Regulation of the Fecl-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. Curr. Opin. Microbiol., v. 6, p. 173–180, 2003.
- BRISSETTE, J. L.; RUSSEL, M.; WEINER, L.; MODEL, P. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 862–866, 1990.
- BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 57-65, 2004.

- BRUN, Y. V.; SHAPIRO, L. A temporally controlled sigma-factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter*. Genes Dev., v. 6, p. 2395–2408, 1992.
- BUCK, M.; GALLEGOS, M. T.; STUDHOLME, D. J.; GUO, Y.; GRALLA, J. D. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. J. Bacteriol., v. 182, p. 4129-4136, 2000.
- BURGESS, R. R.; KNUTH, M. W. Purification of a recombinant protein overproduced in *Escherichia coli*. In: Marshak, D. R.; Kadonaga, J. T.; Burgess, R. R.; Knuth, M.; Brennan, W. A.; Lin, S. H. (ed.). Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. p. 205-274.
- BURGESS, R. R.; TRAVERS, A. A.; DUNN, J. J.; BAUTZ, E. K. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. **Nature**, v. 221, p. 43–46, 1969.
- CASES, I.; DE LORENZO, V. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 105-118, 2005.
- CASES, I.; USSERY, D. W.; DE LORENZO, V. The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 1281-1293, 2003.
- CHANG, C. J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVE, J. M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Curr. Microbiol., v. 27, p. 137-142, 1993.
- CHEN, W. P.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gramnegative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 2260, 1993.
- CHUANG, S. E.; DANIELS, D. L.; BLATTNER, F. R. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., v. 175, p. 2026-2036, 1993.
- CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 2, p. 363-378, 2004.
- CRAIG, N. L.; NASH, H. A. *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. **Cell.**, v. 39, p. 707-716, 1984.
- DA SILVA NETO, J. F.; KOIDE, T.; GOMES, S. L.; MARQUES, M. V. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 210, p. 105-110, 2002.
- DANESE, P. N.; SILHAVY, T. J. The σ^E and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. **Genes Dev.**, v. 11, p. 1183–1193, 1997.
- DANESE, P. N.; SNYDER, W. B.; COSMA, C. L.; DAVIS, L. J.; SILHAVY, T. J. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates

transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. **Genes Dev.**, v. 9, p. 387–398, 1995.

- DARTIGALONGUE, C.; MISSIAKAS, D.; RAINA, S. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. J. Biol. Chem., v. 276, p. 20866-20875, 2001.
- DARWIN, A. J. The phage-shock-protein response. **Mol. Microbiol.**, v. 57, p. 621–628, 2005.
- DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. Axenic culture of the bacteria associated with phony peach disease of peach and plum leaf scald. **Current. Microbiol.**, v. 6, p. 309-314, 1981.
- DE LAS PEÑAS, A. L.; CONNOLY, L.; GROSS, C. A. σ^E is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 6862-6864, 1997.
- DE SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G. M.; MUTO, N. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; MACHADO, M. A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 16, p. 867-875, 2003.
- DE WULF, P.; MCGUIRE, A. M.; LIU, X.; LIN, E. C. Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli.* J. Biol. Chem., v. 277, p. 26652–26661, 2002.
- DOMBRECHT, B.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely related species of the Rhizobiales. **Genome Biol.**, v. 3, p. 0076.1–0076.11, 2002.
- DOW, J. M.; DANIELS, M. J. Xylella genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v. 17, p. 263-271, 2000.
- DUPUY, B.; MATAMOUROS, S. Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in Clostridium species by a new subgroup of RNA polymerase sigma-factors. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 201-205, 2006.
- DURET, S.; DANET, J. L.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J. Gene disruption through homologous recombination in *Spiroplasma citri*: an *scm1*-disrupted motility mutant is pathogenic. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 7449-7456, 1999.
- EHIRA, S.; OHMORI, M. NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120. **Mol. Microbiol.**, v. 59, p. 1692-1703, 2006.
- EHIRA, S.; OHMORI, M.; SATO, N. Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120. **DNA Res.**, v. 10, p. 97-113, 2003.

- EL-SAMAD, H.; KURATA, H.; DOYLE, J. C.; GROSS, C. A.; KHAMMASH, M. Surviving heat shock: control strategies for robustness and performance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 102, p. 2736-2741, 2005.
- ERICKSON, J. W.; GROSS, C. A. Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. **Genes Dev.**, v. 3, p. 1462–1471, 1989.
- ERICKSON, J. W.; VAUGHN, V.; WALTER, W. A.; NEIDHARDT, F. C.; GROSS, C. A. Regulation of the promoters and transcripts of rpoH, the *Escherichia coli* heat shock regulation gene. **Genes Dev.**, v. 1, p. 419-432, 1987.
- FEIL, H.; FEIL, W. S.; DETTER, J. C.; PURCELL, A. H.; LINDOW, S. E. Site-directed disruption of the *fimA* and *fimF* fimbrial genes of *Xylella fastidiosa*. Phytopathology, v. 93, p. 675-682, 2003.
- FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem., v. 132, p. 6-13, 1993.
- FIROVED, A. M., BOUCHER, J. C., DERETIC, V. Global genomic analysis of AlgU (sigmaE)-dependent promoters (sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. J. Bacteriol., v. 184, p. 1057-1064, 2002.
- GAO, H.; WANG, Y.; LIU, X.; YAN, T.; WU, L.; ALM, E.; ARKIN, A.; THOMPSON, D.
 K.; ZHOU, J. Global transcriptome analysis of the heat shock response of Shewanella oneidensis. J. Bacteriol., v. 186, p. 7796-7803, 2004.
- GARDY, J. L.; LAIRD, M. R.; CHEN, F.; REY, S.; WALSH, C. J.; ESTER, M.; BRINKMAN, F. S. L. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. **Bioinformatics**, v. 21, p. 617-623, 2005.
- GAURIVAUD, P.; SOUZA, L. C.; VIRGILIO, A. C.; MARIANO, A. G.; PALMA, R. R.;
 MONTEIRO, P. B. Gene Disruption by Homologous Recombination in the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis Strain. Appl. Environ. Microbiol., v. 68, p. 4658-4665, 2002.
- GERTZ, S.; ENGELMANN, S.; SCHMID, R.; ZIEBANDT, A. K.; TISCHER, K.; SCHARF, C.; HACKER, J.; HECKER, M. Characterization of the sigmaB Regulon in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6983–6991, 2000.
- GIL, H.; BENACH, J. L.; THANASSI, D. G. Presence of Pili on the Surface of *Francisella tularensis*. Infect. Immun., v. 72, p. 3042–3047, 2004.
- GRIGOROVA, I. L.; PHLEGER, N. J.; MUTALIK, V. K.; GROSS, C. A. Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 103, p. 5332-5337, 2006.

- GROSSMAN, A. D.; ERICKSON, J. W.; GROSS, C. A. The htpR gene product of E. coli is a sigma factor for heat-shock promoters. **Cell**, v. 38, p. 383-390, 1984.
- GRUBER, T. M.; GROSS, C. A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. **Annu.Rev.Microbiol.**, v. 57, p. 441-466, 2003.
- GUILHABERT, M. R.; HOFFMAN, L. M.; MILLS, D. A.; KIRKPATRICK, B. C. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 14, p. 701-706, 2001.
- GUILHABERT, M. R.; KIRKPATRICK, B. C. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 18, p. 856-868, 2005.
- HAHN, M. Y.; RAMAN, S.; ANAYA, M.; HUSSON, R. N. The Mycobacterium tuberculosis extracytoplasmic-function sigma factor SigL regulates polyketide synthases and secreted or membrane proteins and is required for virulence. J. Bacteriol., v. 187, p. 7062-7071, 2005.
- HAMILTON, H. L.; SCHWARTZ, K. J.; DILLARD, J. P. Insertion-duplication mutagenesis of *neisseria*: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 4718-4726, 2001.
- HAN, Y.; ZHOU, D.; PANG, X.; SONG, Y.; ZHANG, L.; BAO, J.; TONG, Z.; WANG, J.; GUO, Z.; ZHAI, J.; DU, Z.; WANG, X.; ZHANG, X.; WANG, J.; HUANG, P.; YANG, R. Microarray analysis of temperature-induced transcriptome of Yersinia pestis. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, p. 791-805, 2004.
- HANAHAN D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol., v. 166, p. 557, 1983.
- HELMANN, J. D. Anti-sigma factors. Curr. Opin. Microbiol., v. 2, p. 135–141, 1999.
- HELMANN, J. D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 46, p. 47-110, 2002.
- HELMANN, J. D.; CHAMBERLIN, M. J. Structure and function of bacterial sigma factors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 839-872, 1988.
- HENDRICKSON, E. L.; GUEVERA, P.; AUSUBEL, F. M. The alternative sigma factor *RpoN* is required for *hrp* activity in Pseudomonas syringae pv. maculicola and acts at the level of *hrpL* transcription. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 3508-3516, 2000.
- HENDSON, M.; PURCELL, A. H.; CHEN, D.; SMART, C.; GUILHABERT, M.; KIRKPATRICK, B. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of Xylella fastidiosa. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 895-903, 2001.
- HENGGE-ARONIS R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in
control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 373-395, 2002.

- HIRATSU, K.; AMEMURA, M.; NASHIMOTO, H.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K. The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes sigma E, is essential for bacterial growth at high temperature. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 2918-2922, 1995.
- HIRSCHMAN, J.; WONG, P. K.; SEI, K.; KEENER, J.; KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7525-7529, 1985.
- HOPKINS, D. L.; PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Dis.**, v. 86, p. 1056–1066, 2002.
- HUGHES, K.; MATHEE, K. The anti-sigma factors. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 231–286, 1998.
- HUNT, T. P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**,v. 82, p. 8453-8457, 1985.
- ISHIHAMA, A. Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 499-518, 2000.
- ISHIMOTO, K. S.; LORY, S. Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA, v. 86, p. 1954-1957, 1989.
- ISHIMOTO, K. S.; LORY, S. Identification of *pilR*, which encodes a transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin gene. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 3514-3521, 1992.
- JANASZAK, A.; MAJCZAK, W.; NADRATOWSKA, B.; SZALEWSKA-PALASZ, A.; KONOPA, G.; TAYLOR, A. A sigma54-dependent promoter in the regulatory region of the Escherichia coli rpoH gene. **Microbiology**, v. 153, p. 111-123, 2007.
- JISHAGE, M.; IWATA, A.; UEDA, S.; ISHIHAMA, A. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. J. Bacteriol., v. 178, p. 5447– 5451, 1996.
- JISHAGE, M.; KVINT, K.; SHINGLER, V.; NYSTROM, T. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. **Genes Dev.**, v. 16, p. 1260-1270, 2002.
- KANG, Y.; LIU, H.; GENIN, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 427–437, 2002.

- KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 69, p. 527-543, 2005.
- KEEN, N. T.; DUMENYO, C. K.; YANG, C. H.; COOKSEY, D. A. From rags to riches: insights from the first genomic sequence of a plant pathogenic bacterium. Genome Biol., v. 1, p. 1019.1-1019.4, 2000.
- KEITH, L. M.; BENDER, C. L. AlgT (sigma22) controls alginate production and tolerance to environmental stress in Pseudomonas syringae. J. Bacteriol., v. 181, p. 7176-7184, 1999.
- KESELER, I. M.; KAISER, D. Sigma54, a vital protein for *Myxococcus xanthus*. **Proc.** Natl. Acad. Sci. USA, v. 94, p. 1979-1984, 1997.
- KOIDE, T.; ZAINI, P. A.; MOREIRA, L. M.; VÊNCIO, R. Z. N.; MATSUKUMA, A. Y.; DURHAM, A. M.; TEIXEIRA, D. C.; EL-DORRY, H.; MONTEIRO, P. B.; DA SILVA, A. C. R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DA SILVA, A. M.; GOMES, S. L. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. J. Bacteriol., v. 186, p. 5442-5449, 2004a.
- KOIDE, T.; DA SILVA NETO, J. F.; GOMES, S. L.; MARQUES, M. V. Insertional transposon mutagenesis in the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis strain with transposome. **Current. Microbiol.**, v. 48, p. 247-250, 2004b.
- KOIDE, T.; VENCIO, R. Z. N.; GOMES, S. L. Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. J. Bacteriol., v. 188, 5821-5830, 2006.
- KOVACIKOVA, G.; SKORUPSKI, K. The alternative sigma factor sigma(E) plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. Infect. Immun., v. 70, p. 5355-5362, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 676-685, 1970.
- LAMBAIS, M. R.; GOLDMAN, M. H.; CAMARGO, L. E.; GOLDMAN, G. H. A genomic approach to the understanding of Xylella fastidiosa pathogenicity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, p. 459-462, 2000.
- LANDICK, R.; VAUGHN, V.; LAU, E. T.; VANBOGELEN, R. A.; ERICKSON, J. W.; NEIDHARDT, F. C. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. **Cell**, v. 38, p. 175-182, 1984.
- LARTIGUE, C.; DURET, S.; GARNIER, M.; RENAUDIN, J. New plasmid vectors for speci.c gene targeting in *Spiroplasma citri*. **Plasmid**, v. 48, p. 149-159, 2002.

- LAURIE, A. D.; BERNARDO, L. M.; SZE, C. C.; SKARFSTAD, E.; SZALEWSKA-PALASZ, A.; NYSTRÖM, T.; SHINGLER, V. The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 1494–1503, 2003.
- LEA, P. J.; SODEK, L.; PARRY, M. A. J.; SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, v. 150, p. 1–26, 2007.
- LEE, M. S.; SEOK, C.; MORRISON, D. A. Insertion-duplication mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4796-4802, 1998.
- LEITE, B.; ANDERSEN, P. C.; ISHIDA, M. L. Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for Xylella fastidiosa. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 283-290, 2004.
- LELOUP, L.; EHRLICH, S. D.; ZAGOREC, M.; MOREL-DEVILLE, F. Singlecrossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsl* and *lacL* genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 2117-2123, 1997.
- LEMAUX, P. G.; HERENDEEN, S. L.; BLOCH, P. L.; NEIDHARDT, F. C. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. **Cell**, v. 13, 427–434, 1978.
- LEMOS, E. G.; ALVES, L. M.; CAMPANHARO, J. C. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 219, p. 39-45, 2003.
- LI, Y.; HAO, G.; GALVANI, C. D.; MENG, Y.; DE LA FUENTE, L.; HOCH, H. C.; BURR, T. J. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. **Microbiology**, v. 153, p. 719-726, 2007.
- LIPINSKA, B.; SHARMA, S.; GEORGOPOULOS, C. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 10053-10067, 1988.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC}_T Method. **Methods**, v. 25, p. 402– 408, 2001.
- LONETTO, M. A.; BROWN, K. L.; RUDD, K. E.; BUTTNER, M. J. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 7573-7577, 1994.

- LONETTO, M.; GRIBSKOV, M.; GROSS, C. A. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 3843-3849, 1992.
- LOPES, S. A.; RIBEIRO, D. M.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; SANTOS, J. M. Nicotiana tabacum as an experimental host for the study of plant–Xylella fastidiosa interactions. **Plant Dis.,** v. 84, p. 827-830, 2000.

LOSICK, R.; PERO, J. Cascades of sigma factors. Cell, v. 25, p. 582–584, 1981.

- MAGNUSSON, L. U.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in Escherichia coli. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 236-242, 2005.
- MARTINEZ-ANTONIO, A.; COLLADO-VIDES, J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 482-489, 2003.
- MATHEWS, S. A.; VOLP, K. M.; TIMMS, P. Development of a quantitative gene expression assay for *Chlamydia trachomatis* identified temporal expression of sigma factors. **FEBS Lett.**, v. 458, p. 354–358, 1999.
- MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 289-314, 2002.
- MATTICK, J. S.; WHITCHURCH, C. B.; ALM, R. A. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. **Gene**, v. 179, p. 147-155, 1996.
- MECSAS, J.; ROUVIERE, P. E.; ERICKSON, J. W.; DONOHUE, T. J.; GROSS, C. A. The activity of σE, an Escherichia coli heat-inducible σ-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. **Genes Dev.**, v. 7, p. 2618–2628, 1993.
- MENG, Y.; LI, Y.; GALVANI, C. D.; HAO, G.; TURNER, J. N.; BURR, T. J.; HOCH, H.
 C. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. J.
 Bacteriol., v. 187, p. 5560-5567, 2005.
- MERRICK, M. J. In a class of its own the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). **Mol. Microbiol.**, v. 10, p. 903-909, 1993.
- MIOT, M.; BETTON, J. M. Protein quality control in the bacterial periplasm. Microb. Cell Fact., v. 3, p. 4, 2004.
- MISSIAKAS, D.; BETTON, J. M.; RAINA, S. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of Escherichia coli SurA, FkpA and Skp/OmpH. Mol. Microbiol., v. 21, p. 871-884, 1996.
- MISSIAKAS, D.; MAYER, M. P.; LEMAIRE, M.; GEORGOPOULOS, C.; RAINA, S. Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-

factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 355-371, 1997.

- MITICKA, H., ROWLEY, G., REZUCHOVA, B., HOMEROVA, D., HUMPHREYS, S., FARN, J., ROBERTS, M., KORMANEC, J. Transcriptional analysis of the rpoE gene encoding extracytoplasmic stress response sigma factor sigmaE in Salmonella enterica serovar Typhimurium. FEMS Microbiol. Lett., v. 226, p. 307-314, 2003.
- MITTENHUBER, G. An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, p. 77–91, 2002.
- MOGENSEN, J. E.; OTZEN, D. E. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 57, p. 326-346, 2005.
- MONTEIRO, P. B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; AYRES, A. J.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Catharanthus roseus, an experimental host plant for the citrus strain of Xylella fastidiosa. **Plant Dis.**, v. 85, p. 246-251, 2001a.
- MONTEIRO, P. B.; TEIXEIRA, D. C.; PALMA, R. R.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M.; RENAUDIN, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, 2263-2269, 2001b.
- MOONEY, R. A.; DARST, S. A.; LANDICK, R. Sigma and RNA polymerase: an onagain, off-again relationship? **Mol. Cell.**, v. 20, p. 335-345, 2005.
- MOREIRA, L. M.; DE SOUZA, R. F.; ALMEIDA, JR. N. F.; SETUBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; DA SILVA, A. C. R. Comparative genomics analysis of citrus-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., v. 42, p. 163-1184, 2004.
- MORETT, E.; SEGOVIA, L. The sigma 54 bacterial enhancerbinding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. J. Bacteriol., v. 175, p. 6067-6074, 1993.
- MORITA, M. T.; TANAKA, Y.; KODAMA, T. S.; KYOGOKU, Y.; YANAGI, H.; YURA, T. Translational induction of heat shock transcription factoro³²: evidence for a built-in RNA thermosensor. **Genes Dev.**, v. 13, p. 655-665, 1999.
- NARBERHAUS, F. Negative regulation of bacterial heat shock genes. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1-8, 1999.
- NEWMAN, K. L.; ALMEIDA, R. P.; PURCELL, A. H.; LINDOW, S. E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 1737-1742, 2004.
- NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 172-179, 2000.

- NONAKA, G.; BLANKSCHIEN, M.; HERMAN, C.; GROSS, C. A.; RHODIUS, V. A. Regulon and promoter analysis of the E. coli heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. **Genes Dev.**, v. 20, p.1776-1789, 2006.
- NUNES, L. R.; ROSATO, Y. B.; MUTO, N. H.; YANAI, G. M.; DA SILVA, V. S.; LEITE, D. B.; GONÇALVES, E. R.; DE SOUZA, A. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; LOPES, S. A.; DE OLIVEIRA, R. C. Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Res.**, v. 13, p. 570-578, 2003.
- OLIVER, D. B. Periplasm. In: Edited by Neidhardt, F. C.; Curtiss, R. III; Ingraham, J. L.; Lin, E. C. C.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Reznikoff, W. S.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umbarger, H. E. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 1996. p. 88-103.
- OSANAI, T.; IMAMURA, S.; ASAYAMA, M.; SHIRAI, M.; SUZUKI, I.; MURATA, N.; TANAKA, K. Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in Synechocystis sp. PCC 6803. **DNA Res.**, v. 13, p. 185-195, 2006.
- PAGET, M, S.; HELMANN, J. D. The sigma70 family of sigma factors. **Genome Biol.**, v. 4, p. 203, 2003.
- PARKER, D.; KENNAN, R. M.; MYERS, G. S.; PAULSEN, I. T.; SONGER, J. G.; ROOD, J. I. Regulation of type IV fimbrial biogenesis in *Dichelobacter nodosus*. J. Bacteriol., 188, p. 4801-4811, 2006.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 124, p. 715-727, 2006.
- POGLIANO, J. A.; LYNCH, S.; BELIN, D.; LIN, E. C. C.; BECKWITH, J. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. **Genes Dev.**, v. 11, p. 1169– 1182, 1997.
- PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol, v. 34, p. 131-151, 1996.
- PURCINO, R. P.; MEDINA, C. L.; MARTINS, D.; WINCK, F. V.; MACHADO, E. C.; NOVELLO J. C.; MACHADO, M. A.; MAZZAFERA, P. Xylella fastidiosa disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange Citrus sinensis cv. Pera. J. Exp. Bot., v. 58, p. 2733-2744, 2007.
- QIN, X.; HARTUNG, J. S. Construction of a shuttle vector and transformation of Xylella fastidiosa with plasmid DNA. **Curr. Microbiol.**, v. 43, p. 158-162, 2001.
- RAFFA, R. G.; RAIVIO, T. L. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 1599–1611, 2002.

- RAINA, S.; MISSIAKAS, D.; GEORGOPOULOS, C. The rpoE gene encoding the σE (σ24) heat shock sigma factor of Escherichia coli. **EMBO J.**, v. 14, p. 1043-1055, 1995.
- RAIVIO, T. L. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 56, p. 1119-1128, 2005.
- RAMOS, J. L.; GALLEGOS, M. T.; MARQUES, S.; RAMOS-GONZALEZ, M. I.; ESPINOSA-URGEL, M.; SEGURA, A. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 166-171, 2001.
- REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R.; BLUA, M. J.; MIZELL, R. F. 3rd; ANDERSEN, P. C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of Xylella fastidiosa and their relation to disease epidemiology. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 243-270, 2004.
- REITZER, L. J. Sources of nitrogen and their utilization. In: Edited by Neidhardt, F. C.; Curtiss, R. III; Ingraham, J. L.; Lin, E. C. C.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Reznikoff, W. S.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umbarger, H. E. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 1996. p. 380–390.
- REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Transcription of glnA in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. **Cell**, v. 45, p. 785-792, 1986.
- REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155-576, 2003.
- REITZER, L.; SCHNEIDER, B. L. Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 65, p. 422-444, 2001.
- REZUCHOVA, B.; MITICKA, H.; HOMEROVA, D.; ROBERTS, M.; KORMANEC, J. New members of the *Escherichia coli* sigmaE regulon identified by a two-plasmid system. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 225, p. 1-7, 2003.
- RHODIUS, V. A.; LAROSSA, R. A. Uses and pitfalls of microarrays for studying transcriptional regulation. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 114-119, 2003.
- RHODIUS, V. A.; SUH, W. C.; NONAKA, G.; WEST, J.; GROSS, C. A. Conserved and Variable Functions of the sigma(E) Stress Response in Related Genomes. **PLoS Biol.**, v. 4, p. e2, 2006.
- ROSEN, R.; RON, E. Z. Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 21, p. 244-265, 2002.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVE, J. M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R. R.; QUAGGIO, J. A.; DENEGRI, J. D. Présence des bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. [Title translation: Occurence of xylem-restricted bacteria in sweet-orange

trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil]. C. R. Acad. Sci. Paris série III, v. 310, p. 345-349, 1990.

- ROWLEY, G.; SPECTOR, M.; KORMANEC, J.; ROBERTS, M. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 383-394, 2006.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.; CHANG, C. J. Xylella fastidiosa subspecies: X. fastidiosa subsp piercei, subsp. nov., X. fastidiosa subsp. multiplex subsp. nov., and X. fastidiosa subsp. pauca subsp. nov. Syst. Appl. Microbiol., v. 27, p. 290-300, 2004.
- SCHURR, M. J.; YU, H.; MARTINEZ-SALAZAR, J. M.; BOUCHER, J. C.; DERETIC, V. Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. J. Bacteriol., v. 178, p. 4997-5004, 1996.
- SETUBAL, J. C.; MOREIRA, L. M.; DA SILVA, A. C. Bacterial phytopathogens and genome science. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 595-600, 2005.
- SHINGLER, V. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Mol. Microbiol.**, v. 19, p. 409-416, 1996.
- SILBERBACH, M.; HÜSER, A.; KALINOWSKI, J.; PÜHLER, A.; WALTER, B.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. J. Biotechnol., v. 119, p. 357-367, 2005.
- SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVE, J. M.; BRIONES, M. R.; BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.: DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANCA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOPES, A. S.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L.; NETTO, L. E.; NHANI, A. JR.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.; PEREIRA, H. A. JR.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; DE M ROSA, A. J.; DE ROSA, V. E. JR.; DE SA, R. G.;

SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, F. R.; DA SILVA, W. A. JR.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENZI, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A.L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature**, v. 406, p. 151-159, 2000.

- SMOLKA, M. B.; MARTINS, D.; WINCK, F. V.; SANTORO, C. E.; CASTELLARI, R. R.; FERRARI, F.; BRUM, I. J.; GALEMBECK, E.; DELLA COLETTA FILHO, H.; MACHADO, M. A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. **Proteomics**, v. 3, p. 224-237, 2003.
- SOUZA, L. C.; WULFF, N. A.; GAURIVAUD, P.; MARIANO, A. G.; VIRGILIO, A. C.; AZEVEDO, J. L.; MONTEIRO, P. B. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC *gumB* and *gumF* genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 2, p. 236-242, 2006.
- STUDHOLME, D. J. Enhancer-dependent transcription in Salmonella enterica Typhimurium: new members of the sigmaN regulon inferred from protein sequence homology and predicted promoter sites. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., v. 4, p. 367-374, 2002.
- STUDHOLME, D. J.; BUCK, M. The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in Bacteria: insights from genome sequences. **FEMS Microbiol.** Lett., v. 186, p. 1–9, 2000.
- STUDHOLME, D. J.; BUCK, M.; NIXON, B. T. Identification of potential σ^N-dependent promoters in bacterial genomes. **Microbiology**, v. 146, p. 3021-3023, 2000.
- STUDHOLME, D. J.; DIXON, R. Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1757-1767, 2003.
- TOLONEN, A. C.; AACH, J.; LINDELL, D.; JOHNSON, Z. I.; RECTOR, T.; STEEN, R.; CHURCH, G. M.; CHISHOLM, S. W. Global gene expression of Prochlorococcus ecotypes in response to changes in nitrogen availability. **Mol. Syst. Biol.**, v. 2, p. 53, 2006.
- TOTTEN, P. A.; LARA, J. C.; LORY, S. The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 389-396, 1990.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

- VAN SLUYS, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MIYAKI, C. Y.; FURLAN, L. R.; CAMARGO, L. E.; DA SILVA, A. C.; MOON, D. H.; TAKITA, M. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. A.; FERRO, M. I.; DA SILVA, F. R.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H.; LEMOS, M. V.; EL-DORRY, H.; TSAI, S. M.; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; SIQUEIRA, W. J.; COUTINHO, L. L.; KIMURA, E. T.; FERRO, E. S.; HARAKAVA, R.; KURAMAE, E. E.; MARINO, C. L.; GIGLIOTI, E.; ABREU, I. L.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BAIA, G. S.; BLANCO, S. R.; BRITO, M. S.; CANNAVAN, F. S.; CELESTINO, A. V.; DA CUNHA, A. F.; FENILLE, R. C.; FERRO, J. A.; FORMIGHIERI, E. F.; KISHI, L. T.; LEONI, S. G.; OLIVEIRA, A. R.; ROSA, V. E. JR; SASSAKI, F. T.; SENA, J. A.; DE SOUZA, A. A.; TRUFFI, D.; TSUKUMO, F.; YANAI, G. M.; ZAROS, L. G.; CIVEROLO, E. L.; SIMPSON, A. J.; ALMEIDA, N. F. JR; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of Xylella fastidiosa. J. Bacteriol., v. 185, p. 1018-1026, 2003.
- VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; MENCK, C. F.; DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P.; SIMPSON, A. J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol, v. 40, p. 169-189, 2002.
- VÊNCIO, R. Z. N.; KOIDE, T. HTself: Self-Self Based Statistical Test for Low Replication Microarray Studies. **DNA Res.**, v. 12, p. 211-214, 2005.
- WADE, J. T.; ROA, D. C.; GRAINGER, D. C.; HURD, D.; BUSBY, S. J.; STRUHL, K.; NUDLER, E. Extensive functional overlap between sigma factors in Escherichia coli. Nat. Struct. Mol. Biol., v. 13, p. 806-814, 2006.
- WANG, Q.; KAGUNI, J. M. A novel sigma factor is involved in expression of the rpoH gene of Escherichia coli. J. Bacteriol., v. 171, p. 4248-4253, 1989.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H. Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int. J. Syst. Bacteriol., v. 37, p. 136-143, 1987.
- WOSTEN, M. M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 22, p. 127-150, 1998.
- WU, S. S.; KAISER, D. Regulation of expression of the p*ilA* gene in *Myxococcus xanthus.* **J. Bacteriol.**, 179, p. 7748-7758, 1997.
- XU, H.; HOOVER, T.R. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. Curr. Opin. Microbiol., v. 4, p. 138–144, 2001.
- YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T. P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Res., v. 30, p. e15, 2002.

- YURA T. Regulation and conservation of the heat-shock transcription factor σ^{32} . **Genes Cells**, v. 1, p. 277-84, 1996.
- YURA, T.; NAKAHIGASHI, K. Regulation of the heat-shock response. Curr. Opin. Microbiol., v. 2, p.153-8, 1999.
- ZHANG, J.; MADDEN, T. L. PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. Genome Res., v. 7, p. 649-656, 1997.
- ZHANG, X.; CHANEY, M.; WIGNESHWERARAJ, S. R.; SCHUMACHER, J.; BORDES, P.; CANNON, W.; BUCK, M. Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 895-903, 2002.
- ZHAO, K.; LIU, M.; BURGESS, R. R. The global transcriptional response of Escherichia coli to induced sigma 32 protein involves sigma 32 regulon activation followed by inactivation and degradation of sigma 32 in vivo. J. Biol. Chem., v. 280, p. 17758-17768, 2005.
- ZHOU, Y. N.; KUSUKAWA, N.; ERICKSON, J. W.; GROSS, C. A.; YURA, T. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor sigma 32. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 3640-3649, 1988.
- ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L.; WENDISCH, V. F.; KHODURSKY, A. B.; PETER, B. J.; BENDER, R. A.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein Ccontrolled genes of Escherichia coli: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 14674-1467, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1

Genes induzidos em carência de nitrogênio

Tabela S1: Genes induzidos em carência de nitrogênio na linhagem J1a12 de X. *fastidiosa.* Os genes estão ordenados pelo padrão de indução na série temporal. $M = \log da$ razão da intensidade de fluorescência na carência de nitrogênio (XDM₀) em relação à condição controle (XDM₂). Os valores de M considerados induzidos estão destacados em negrito.

				$M = \log_2(XDM_0/XD)$		XDM ₂)
Gene.ID	Produto	Gene	Categoria funcional	2 horas	8 horas	12 horas
XF0352	pentaphosphate guanosine-3'-pyrophosphohydrolase	SPOT	I.D	1.64	0.378	-0.751
XF0437	conserved hypothetical protein	YBDG	VIII.A	1.01	0.522	0.0265
XF0568	conserved hypothetical protein	RDGC	VIII.A	1.06	-0.246	-0.892
XF0830	hypothetical protein		VIII.B	1.23	-0.846	0.654
XF0831	cysteine synthase	CYSK	II.A.3	1.51	-0.606	0.0906
XF0847	beta-hexosaminidase precursor	NAHA	IV.A.2	1.03	1.99	-1.54
XF0873	outer membrane protein	jhp1472	IV.A.2	1.04	0.507	-0.232
XF0928	conserved hypothetical protein	SUN	VIII.A	1.5	-0.294	-0.964
XF1049	phosphatidate cytidylyltransferase	CDSA	II.E	1.5	-1.58	-0.718
XF1078	DNA uptake protein	COMA	IX	1.71	1.73	-1.58
XF1117	hypothetical protein		VIII.B	1.61	0.731	-0.886
XF1250	arginine deaminase	rocF	I.A.2	2.19		-0.496
XF1252	conserved hypothetical protein	b2520	VIII.A	1.19	0.808	-0.773
XF1255	hypothetical protein		VIII.B	0.988	0.256	1.11
XF1311	rod shape-determining protein	MRED	IV.B	1.5	1.21	-1.75
XF1366	hypothetical protein		VIII.B	1.48	0.181	-1.27
XF1497	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase	CYSH	I.B.12	1.71	0.917	-0.56
XF1499	NADPH-sulfite reductase, flavoprotein subunit	CYSJ	I.B.12	1.14	0.431	-0.567
XF1512	protoporphyrinogen oxidase	HEMK	II.D.12	4.45	3.17	-1.44
XF1648	hypothetical protein		VIII.B	1.13	0.899	-1.66
XF1719	hypothetical protein		VIII.B	2.6	0.436	-1.17
XF1819	threonine dehydratase catabolic	TDCB	I.A.2	1.09	-1.09	-0.624
XF1821	acetolactate synthase isozyme II, large subunit	ILVG	II.A.2	1.18	-1.29	-0.518
XF1822	ketol-acid reductoisomerase	ILVC	II.A.2	1.06	0.186	0.446
XF1841	undecaprenol kinase	bacA	VII.C	1.02	0.381	-0.165
XF2251	solute:Na+ symporter	рра	V.A.7	1.37	0.727	0.0729
XF2274	hypothetical protein		VIII.B	0.987	0.459	0.587
XF2342	heat-inducible transcriptional repressor	HRCA	I.D	2.38	2.63	-0.615
XF2427	hypothetical protein		VIII.B	0.998	0.105	-0.41
XF2563	asparaginyl-tRNA synthetase	ASNS	III.B.4	1.15	-0.691	-1.85
XF2709	glutamate synthase, beta subunit	GLTD	II.A.1	1.4	0.928	-0.722
XF2710	glutamate synthase, alpha subunit	GLTB	II.A.1	1.06	0.0386	-0.586
XF0036	aromatic-amino-acid aminotranferase	tyrB	II.A.4	0.569	0.969	0.564
XF0105	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase	KDTA	IV.C	1.55	1.28	-0.639
XF0122	LexA repressor	lexA	I.D	0.691	1.29	0.454
XF0128	cysteine synthase	Y4XP	II.A.3	1.81	1.31	-1.02
XF0165	beta-lactamase induction signal transducer protein	AMPG	VII.C	0.48	0.866	0.724
XF0189	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	BIOA	II.D.1	0.542	0.896	-0.549
XF0264	hypothetical protein		VIII.B	0.0512	0.814	0.915
XF0284	hypothetical protein		VIII.B	1.04	1.11	0.389

XF0308	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO4 subunit	nuoD	I.C.1	0.314	1.27	-0.944
XF0320	Mg++/citrate complex transporter	CITN	V.A.3	1.01	1.5	3.73
XF0347	D-lactate dehydrogenase	dld1	I.C.1	0.876	1.09	-0.326
XF0356	cytochrome P-450 hydroxylase	SCH10.1	II.D.1	0.899	1.19	0.0509
XF0465	GTP-binding protein	YFGK	IX	1.29	1.58	-0.869
XF0474	hypothetical protein		VIII.B	0.77	1.06	-0.0103
XF0534	hypothetical protein		VIII.B	0.406	1.76	0.878
XF0675	conserved hypothetical protein	HI0457	VIII.A	1.72	1.66	-1.13
XF0739	50S ribosomal protein L35	RPMI	III.B.2	0.379	0.951	1.22
XF0862	hypothetical protein		VIII.B	-4.27	2.62	1.15
XF0895	hypothetical protein		VIII.B	0.85	1.4	-0.432
XF0897	hypothetical protein		VIILB	0.904	1.27	-1.23
XF0933	ferrous iron transport protein B	feoB	V.A.4	0.979	1.11	0.142
XF0998	ornithine carbamovitransferase	ARGE	ILA.1	0.258	0.591	0.493
XE1053	outer membrane protein	OMPP1	IV A 2	0 497	1.22	0.266
XF1054	conserved hypothetical protein	TM1087	VIII A	0.236	0.983	0.608
XF1151	30S ribosomal protein S10	BPS.I	III B 2	0.31	0.679	0.000
XF1152	50S ribosomal protein L3	BPLC	III B 2	0.01	0.652	0.635
XF1270	linoate hiosynthesis protein B		ш	0.007.0	1 17	-2 47
XF1510	nroline imino-pentidase	nin	III C 3	1 22	1 94	-1 03
XF1523	general secretory pathway protein K	PEEK	VII H	1 98	1.54	-1 11
XF1556	hypothetical protein	I EI K	VIII B	0 734	1.00	-0 259
XF1743	esterase	ost		0.704	4 59	0.200
XF1755	conserved hypothetical protein	tiorf29	νΔ	0 448	1 48	-0 394
XF1790	hypothetical protein	101120	VIII.R	0.440	1 10	0.004
XE1815	conserved hypothetical protein	VCED		-0.104	0.01	0.07
XE1817	beta-ketoacyl-[ACP] synthase III	FARH		-0.427	1.05	0.010
XE1881	by notherical protein	I ADIT		0.035	2 12	1 27
XE1015	anthranilate synthese component II	TRPG		2.51	3.26	-0.444
XE1010		ini d	VIII A	1.03	1.20	0.357
XE1046	folulooludutamate synthase/dibudrofolate synthase	FOLC		0.021	0.095	0.0075
XE2066	conserved plasmid protein	VacB	VI B	-0.021	1.05	0.0073
XE2414	bypothetical protein	yacu	VIII B	28	2.38	-1 54
XE2414	GTP-binding protein	VHB7		-0 00015	1 52	0 471
XE2422	by nother the strength in the	TIDZ		-0.00915	1.52	0.471
XE2420	hypothetical protein		VIII.D	0.424	1.00	-0.920
XE2535	two-component system sensor protein	colS		0.424	1.05	0.34
XE2546	two-component system, sensor protein	nilS		0.751	1.1	-0.56
XF2581	hypothetical protein	pilo	VIII B	0.149	1.52	0.00
XF2682	nypothetical protein	MDOG	VIIG	0.140	1.52	0.040
XE2002	conserved hypothetical protein	Mbod		0.754	0.851	0.001
XFa0022	hypothetical protein		VIII.R	-0.478	1 04	1 74
XFa0048	hypothetical protein		VIII B	0.470	1 18	-0.829
XF20040	hypothetical protein		VIII B	-0.542	0 701	0.020
XE0119	hypothetical protein		VIII B	0.342	0.432	0.440
XE0150	hypothetical protein		VIII B	-0 195	0.452	1 75
XE0196	conserved hypothetical protein			0.155	0.400	0 702
XE0000		2020		0.40	0.220	1.06
XE0240	prome upeplicase	901E2 1	\/III A	0.249	0.200	0.00
XE0225	bypothetical protein	5011 2.1		0.40Z	-0.007	1 0
XE0340	disulfide bond formation protain B		VIII.D	-0.21 0 120	-0.021	0 036
XE027/		0300		0.100	0.120	1 /12
XE0375	inper membrane protein	AUID	VIII.D	0.437	0.002 _0 0.00	10
XEU388	hypothetical protein	1000		0.103	0.020	1 /1
/1 0000			v.n	0.1	0.040	

XF0392	methionine adenosyltransferase	METK	I.B.10	0.0859	0.905	1.29
XF0403	hypothetical protein		VIII.B	0.0843	0.568	0.958
XF0493	hypothetical protein		VIII.B	-0.0801	1.32	2.82
XF0535	transposase OrfA		VI.C	-0.336	0.547	1.34
XF0565	conserved hypothetical protein	TM0696	VIII.A	0.199	0.43	0.793
XF0602	hypothetical protein		VIII.B	0.233	0.541	1.02
XF0622	hypothetical protein		VIII.B	-0.232	0.291	1.33
XF0663	hypothetical protein		VIILB	-0.807	-0.569	1.66
XF0672	acyl carrier protein	ACPP	II F	0.0679	0 737	1.17
XF0737	initiation factor IF-3	INFC	III.C.1	0.0965	0.267	0.684
XE0860	hypothetical protein		VIII B	0.309	0 191	1.02
XE1007	hypothetical protein		VIII B	0.34	0.608	1 43
XE1010	hypothetical protein		VIII B	0.04	0.826	1 97
XE1035	hypothetical protein		VIII B	0.201	0.020	1.06
XE1056	hypothetical protein		VIII B	0.0000	0.0710	0.654
XE1102	hypothetical protein		VIII B	0.0011	-0 004	1 34
XE1102	DNA polymerase I			0.000	0.004	0 767
XE1153	50S ribosomal protein 1.4			0.102	0.432	0.707
XE1172	205 ribosomal protein 512	rpcM		0.129	0.700	0.990
VE1101			11.0.2	-0.100	0.000	0.952
VE1101	historygycerol lipase precuisor	LIF		0.0901	0.993	1 /
AF1104				-0.0967	0.15	1.4
XF13/9	Codenacyl methicning deserbery less preserving		VII.G	0.169	0.293	1.15
XF1539	S-adenosyl melnionine decarboxylase proenzyme	SPED	II.F	-0.0501	0.328	1.2
XF1547	precursor	рср	IV.A.2	0.0793	0.707	0.888
XF1628	hypothetical protein		VIII.B	0.347	0.275	0.919
XF1890	glutathione peroxidase-like protein	GPO	VII.C	-0.225	0.186	1.28
XF1904	holliday junction binding protein, DNA helicase	RUVA	III.A.4	-0.269	0.676	1.37
XF1949	amidophosphoribosyltransferase	PURF	II.B.1	-0.0212	0.289	0.818
XF2019	Na+:H+ antiporter	YJCE	V.A.4	0.339	0.476	0.847
XF2081	DNA-damage-inducible protein	DINJ	III.A.4	-0.433	0.371	1.92
XF2088	conserved hypothetical protein		VIII.A	0.0414	0.475	1.54
XF2102	hypothetical protein		VIII.B	0.137	0.675	1.61
XF2103	hypothetical protein		VIII.B	0.222	0.51	1.05
XF2185	rare lipoprotein A	RLPA	IV.B	0.182	0.656	0.898
XF2186	conserved hypothetical protein	TP0982	VIII.A	0.0606	0.693	1.58
XF2187	hypothetical protein		VIII.B	0.0834	0.278	1.47
XF2189	hypothetical protein		VIII.B	0.0425	0.413	1.41
XF2380	hypothetical protein		VIII.B	-0.0417	0.488	0.941
XF2395	acetylxylan esterase	axeA	I.A.2	0.206	-0.11	0.797
XF2421	30S ribosomal protein S20	RPST	III.B.2	0.126	0.688	1.11
XF2441	hypothetical protein		VIII.B	-0.122	0.527	0.756
XF2514	hypothetical protein		VIII.B	0.0279	-0.089	1.16
XF2543	hypothetical protein		VIII.B	-0.33	-0.020	1.05
XF2594	conserved hypothetical protein	b2494	VIII.A	0.0445	0.556	1.23
XF2604	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	PHHB	II.D.16	0.0913	-0.79	0.976
XF2608	transcriptional regulator (LuxR/UhpA family)	gacA	I.D	0.111	0.848	0.808
XF2701	hypothetical protein		VIII.B	-0.193	-0.423	0.92
XFa0005	conjugal transfer protein	trbC	VI.B	-0.528	0.628	0.894
XFa0018	hypothetical protein		VIII.B	-0.188	-0.173	0.984
XFa0020	hypothetical protein		VIII.B	-0.163	0.862	1.37
XFa0021	hypothetical protein		VIII.B	0.0938	0.461	1.28
XFa0026	hypothetical protein		VIII.B	-0.256	0.08	0.903
XF0221	hypothetical protein		VIII.B	1.15	1.11	-0.0876
XF0318	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO14 subunit	nuoN	I.C.1	1.04	1.02	-0.0994

XF0413	conserved hypothetical protein	YIGN	VIII.A	2.52	1.38
XF0463	hypothetical protein		VIII.B	2.53	1.82
XF0470	conserved hypothetical protein	YJCC	VIII.A	3.51	2.33
XF0475	hypothetical protein		VIII.B	1.03	1.09
XF0478	fimbrial assembly protein	pilY1	IV.D	1.59	1.15
XF0567	conserved hypothetical protein		VIII.A	1.3	1.58
XF0670	malonyl CoA-ACP transacylase	FABD	II.E	2.09	1.83
XF0775	hypothetical protein		VIII.B	1.68	1.77
XF0863	homoserine O-acetyltransferase	MET2	II.A.2	2.14	1.75
XF0881	hypothetical protein		VIII.B	2.11	2.17
XF0885	hypothetical protein		VIII.B	2.69	2.21
XF0950	riboflavin-specific deaminase	RIBD	II.D.9	1.64	1.36
VENOSS	transcription termination factor	NUSP	III R 5	2.07	2 46

XF0567	conserved hypothetical protein		VIII.A	1.3	1.58	-1.03
XF0670	malonyl CoA-ACP transacylase	FABD	II.E	2.09	1.83	-1.09
XF0775	hypothetical protein		VIII.B	1.68	1.77	-0.918
XF0863	homoserine O-acetyltransferase	MET2	II.A.2	2.14	1.75	0.939
XF0881	hypothetical protein		VIII.B	2.11	2.17	0.327
XF0885	hypothetical protein		VIII.B	2.69	2.21	0.442
XF0950	riboflavin-specific deaminase	RIBD	II.D.9	1.64	1.36	-0.165
XF0955	transcription termination factor	NUSB	III.B.5	2.07	2.46	-1.22
XF0959	hypothetical protein		VIII.B	1.1	1.23	-1.93
XF1081	ABC transporter ATP-binding protein	MSBA	V.A.7	2.28	1.96	-0.431
XF1109	hypothetical protein		VIII.B	1.75	2.06	-1.5
XF1232	hypothetical protein		VIII.B	3.0	2.46	0.411
XF1316	ATP:GTP 3'-pyrophosphotranferase	RELA	I.D	1.56	1.77	-1.14
XF1450	cell division protein	ftsK	V.B	2.16	2.09	0.426
XF1462	glucose/galactose transporter	GLUP	V.A.3	1.2	1.42	-1.16
XF1469	conserved hypothetical protein	shf	VIII.A	1.59	2.45	0.549
XF1658	phage-related repressor protein	CI	VI.A	1.5	1.4	0.017
XF1663	phage-related protein		VI.A	1.38	1.63	-0.918
XF1692	hypothetical protein		VIII.B	2.13	2.14	-0.917
XF1704	hypothetical protein		VIII.B	1.72	1.34	-0.585
XF1804	site-specific DNA-methyltransferase	sphIM	III.A.5	2.65	2.77	-1.54
XF1830	nitrile hydratase activator	None	I.D	1.07	0.935	-0.364
XF1877	hypothetical protein		VIII.B	1.69	2.29	-0.5
XF2053	conjugal transfer protein	trbE	VI.B	1.04	1.47	0.45
XF2222	histidyl-tRNA synthetase	hisS	III.B.4	1.72	1.28	-0.363
XF2506	hypothetical protein		VIII.B	2.22	2.31	-1.03
XF2510	hypothetical protein		VIII.B	1.59	1.17	-0.199
XFa0029	plasmid stabilization protein	parE	VI.B	0.99	1.31	0.289
XFa0047	nickase	taxC	VI.B	0.934	1.22	0.0277
XF1693	hypothetical protein		VIII.B	0.848	0.422	0.817
XF2273	conserved hypothetical protein	HI0882	VIII.A	1.55	0.455	1.11
XF0001	chromosomal replication initiator	DNAA	III.A.1	0.356	0.921	1.02
XF0034	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	PYRF	II.B.2	0.279	1.02	1.46
XF0123	recombination protein RecA	RECA	III.A.3	0.347	1.01	0.92
XF0142	conserved hypothetical protein		VIII.A	-0.00305	0.867	1.26
XF0161	conserved hypothetical protein	yydD	VIII.A	0.0656	1.17	1.58
XF0164	exodeoxyribonuclease	SCE87.2	III.A.4	0.0439	1.37	1.65
XF0169	tyrosyl-tRNA synthetase	TYRS	III.B.4	0.0957	1.01	0.891
XF0180	hypothetical protein		VIII.B	0.453	1.17	1.52
XF0192	ATP-dependent RNA helicase	RHLE	III.B.5	-0.425	1.03	0.968
XF0197	conserved hypothetical protein	DR2514	VIII.A	0.242	1.75	1.61
XF0262	colicin V precursor	CVAC	VII.C	-0.0188	1.06	0.73
XF0324	periplasmic iron-binding protein	afuA	V.A.4	0.373	0.926	0.992
XF0328	hypothetical protein		VIII.B	0.225	1.03	1.3
XF0330	hypothetical protein		VIII.B	0.0673	1.49	1.69
XF0486	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N- acyltransferase	lpxD	IV.C	0.371	1.03	1.09
XF0532	hypothetical protein		VIII.B	0.241	1.26	1.14
XF0533	conserved hypothetical protein		VIII.A	0.367	1.82	2.47
XF0704	phage-related protein		VI.A	-0.129	1.19	1.16

-0.624

-1.13

-1.54

0.137

-0.456

XF0738	hypothetical protein		VIII.B	0.19	1.14	1.62
XF0740	50S ribosomal protein L20	RPLT	III.B.2	0.198	1.09	1.05
XF0997	hypothetical protein		VIII.B	0.192	1.08	1.03
XF1008	hypothetical protein		VIII.B	0.387	1.18	1.97
XF1133	tryptophan repressor binding protein	AF0343	I.D	0.489	0.954	0.864
XF1150	hypothetical protein		VIII.B	0.156	0.873	1.26
XF1185	hypothetical protein		VIII.B	0.106	0.822	1.12
XF1228	hypothetical protein		VIII.B	0.265	0.783	0.935
XF1287	hypothetical protein		VIII.B	0.343	0.728	1.11
XF1493	virulence regulator	xrvA	VII.H	-0.568	0.91	1.49
XF1502	RNA polymerase omega subunit	RPOZ	III.B.5	0.0746	1.2	1.78
XF1534	50S ribosomal protein L31	RPME	III.B.2	0.509	0.849	0.82
XF1655	hypothetical protein		VIII.B	1.39	1.8	1.77
XF1864	phage-related protein		VI.A	-0.00303	1.85	2.73
XF1865	hypothetical protein		VIII.B		5.94	6.08
XF1867	hypothetical protein		VIII.B	-0.0822	1.97	2.24
XF1868	hypothetical protein		VIII.B	0.417	1.92	1.81
XF1869	phage-related protein	None	VI.A	0.197	1.94	2.21
XF1870	phage-related protein	None	VI.A	0.00965	1.62	1.14
XF1875	phage-related protein	None	VI.A	-0.176	1.25	1.89
XF1876	phage-related protein	None	VI.A	0.419	1.83	1.69
XF2043	hypothetical protein		VIII.B	0.184	0.966	1.28
XF2188	hypothetical protein		VIII.B	0.347	0.736	0.975
XF2302	glutamate-1-semialdehvde 2.1-aminomutase	HEML	II.D.12	0.372	1.03	1.29
XF2308	hypothetical protein		VIII.B	0.314	1.36	1.23
XF2336	two-component system, regulatory protein	colR	I.D	0.889	1.09	0.96
XF2366	GumE protein	aumF	VII.F	0.512	1.17	0.943
XF2423	50S ribosomal protein L27	RPMA	I.B.2	0.356	1.07	0.867
XF2424	50S ribosomal protein L21	RPI U	III.B.2	0.457	1.19	1.04
XF2691	RNA polymerase sigma-32 factor	rnoH	LD	0.433	1.0	0.936
XF2781	ribonuclease P	RNPA	III.B 4	-0 11	0.807	1.33
XFa0001	transcriptional regulator			0 463	3.08	2 1
XFa0002	conjugal transfer protein	tral	VIR	0.400	2 81	2.1 2 71
XFa0002	topoisomerase I	TOPA		0.200	2.07	1 40
XFa0004	hypothetical protein		VIII R	-0.463	1 20	1 68
XFa0022	conserved hypothetical protein		νι VIII Δ	0.400	1 14	1 14
XF20020	hypothetical protein			0.112	1 01	0 867
XF20024	conserved hypothetical protein	By0010		-0 11R	0.045	0.007
XF20023	conserved hypothetical protein	STMD1 8	νπ.Α \/ Δ	0.110	16	1 28
XF20025	hypothetical protein		VIII.A \/III R	0.00	1.0	1 27
XF20026	conjugal transfer protein	trbN		0.020	1 11	0.851
XE2004E		UDIN		0.0202	1.11	1 07
XE20040				0.174	1.03	1.9/ 0.11
			VIII.B	-0.0090	1.00	2.11
	cystatinonine gamma-synthase		II.A.2	01.0	1.04	1.2
XF1121	o, io-methylenetetranydroiolate reductase		II.A.2	3.12	2.05	1.95
XF1344	ABC transporter suitate binding protein	spp	V.A.2	1.23	1.07	1.25
XF1500	ATP sulfurylase, small subunit	UYSD	I.B.12	1.83	2.54	2.34
XF1501	ATP sulturylase, large subunit 5-methyltetrahydropteroyltriglutamatehomocysteine		I.B.12	1.23	1.4	0.996
XF22/2	methyltransferase	NEIE	II.A.2	3.07	2.0	2.25
	2					A

ANEXO 2

Genes reprimidos em carência de nitrogênio

Tabela S2: Genes reprimidos em carência de nitrogênio na linhagem J1a12 de X. *fastidiosa.* Os genes estão ordenados pelo padrão de indução na série temporal. $M = \log da$ razão da intensidade de fluorescência na carência de nitrogênio (XDM₀) em relação à condição controle (XDM₂). Os valores de M considerados induzidos estão destacados em negrito.

				M = lo	(DM ₂)	
Gene.ID	Produto	Gene	Categoria funcional	2 horas	8 horas	12 horas
XF0821	transcriptional regulator (Fur family)	ZUR	I.D	-0.878	-0.462	-0.798
XF1388	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit III	CYOC	I.C.3	-0.906	-1.12	-0.763
XF1840	conserved hypothetical protein	zm10orf9	VIII.A	-1.03	-1.12	-1.37
XF2218	histidinol-phosphate aminotransferase	HISC	II.A.5	-1.55	-0.827	-0.837
XF2221	conserved hypothetical protein	yecD	VIII.A	-1.88	-0.399	-0.399
XF2625	heat shock protein	HTPX	VII.G	-0.813	-0.584	-0.646
XF2728	type I restriction-modification system DNA methylase	HP0850	III.A.5	-1.05	-0.395	-0.667
XFa0050	conserved hypothetical protein	orfB	VIII.A	-0.686	0.0614	-0.118
XFa0051	hypothetical protein		VIII.B	-1.03	-0.562	-0.683
XF0067	hypothetical protein		VIII.B	-0.334	-1.58	-0.552
XF0082	chaperone protein precursor	ECPD	IV.A.1	-0.0527	-0.861	-0.553
XF0088	GTP-binding protein	HFLX	IX	-0.317	-1.96	-0.754
XF0116	succinyl-diaminopimelate desuccinylase	dapE	II.A.2	-0.0772	-0.964	-0.725
XF0254	electron transfer flavoprotein beta subunit	ETFB	I.C.3	0.0332	-0.987	-0.224
XF0282	hypothetical protein		VIII.B	-0.351	-1.34	-0.131
XF0396	hypothetical protein		VIII.B	-0.214	-0.833	-0.319
XF0417	hypothetical protein		VIII.B	-0.187	-1.86	-0.723
XF0430	DNA primase	DNAG	III.A.1	-0.325	-1.3	-0.417
XF0457	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPA	I.C.4	-0.183	-0.954	0.0279
XF0592	conserved hypothetical protein		VIII.A	-0.213	-1.38	-0.312
XF0611	dTDP-glucose 4-6-dehydratase	rfbB	IV.C	-0.523	-2.15	-0.806
XF0733	phage-related tail protein	gpD	VI.A	-0.144	-1.38	-0.214
XF0801	cell division protein	FTSA	V.B	-0.232	-1.49	-0.37
XF0802	cell division protein	FTSZ	V.B	-0.195	-0.868	-0.474
XF0857	L-isoaspartate O-methyltransferase	PCM	III.C.1	0.13	-1.23	-0.957
XF0937	hypothetical protein		VIII.B	-0.301	-1.43	-0.977
XF0938	conserved hypothetical protein	None	VIII.A	-0.142	-1.71	-0.595
XF1002	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	AF2071	II.A.1	-0.167	-1.31	-0.638
XF1033	hypothetical protein		VIII.B	-0.207	-1.06	-0.389
XF1162	50S ribosomal protein L14	RPLN	III.B.2	-0.0859	-0.788	-0.591
XF1163	50S ribosomal protein L24	RPLX	III.B.2	-0.214	-0.881	-0.626
XF1166	30S ribosomal protein S8	RPSH	III.B.2	-0.212	-0.757	-0.593
XF1248	hypothetical protein		VIII.B	0.0928	-1.07	-0.488
XF1297	gluconolactonase precursor	SCF11.04	II.C	-0.261	-1.4	-0.813
XF1357	8-amino-7-oxononanoate synthase	BIOF	II.D.1	0.257	-1.31	-0.532
XF1424	chitinase	chi	VII.H	-0.498	-1.02	-0.362
XF1475	ABC transporter ATP-binding protein	YNHD	V.A.7	-0.605	-1.43	-0.912
XF1495	conserved hypothetical protein		VIII.A	-0.289	-0.927	0.235
XF1532	oxidative stress transcriptional regulator	oxyR	VII.C	-0.446	-1.09	-0.764
XF1606	UDP-glucose dehydrogenase	ugd	I.B.11	0.0689	-1.05	-0.718
XF1639	beta-ketoacyl-[ACP] synthase II	FABF	II.E	-0.148	-1.04	-0.501

XF1762	conserved hypothetical protein	SC3D9.16c	VIII.A	-0.443	-1.19	-0.948
XF1765	drug:proton antiporter	MMR	VII.C	-0.187	-1.12	-0.262
XF1818	2-isopropylmalate synthase	LEUA	II.A.2	0.558	-1.32	-0.316
XF1819	threonine dehydratase catabolic	TDCB	I.A.2	1.09	-1.09	-0.624
XF1821	acetolactate synthase isozyme II, large subunit	ILVG	II.A.2	1.18	-1.29	-0.518
XF1888	thiamine biosynthesis protein	THIC	II.D.8	-0.325	-1.18	-0.378
XF1902	holliday junction binding protein, DNA helicase	RUVB	III.A.4	-0.427	-1.05	0.313
XF1959	glycyl-tRNA synthetase beta chain	GLYS	III.B.4	-0.374	-1.19	-0.244
XF1996	transcriptional regulator (PbsX family)	C2	I.D	-0.0339	-1.21	0.219
XF2022	exodeoxyribonuclease I	SBCB	III.A.4	0.143	-1.52	-0.598
XF2048	conjugal transfer protein	trbJ	VI.B	-0.184	-1.15	0.0581
XF2112	conserved hypothetical protein		VIII.A	-0.391	-1.19	-0.188
XF2171	inorganic pyrophosphatase	PPA	I.B.10	-0.478	-0.915	-0.279
XF2206	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	SERA	II.A.3	0.111	-1.31	-0.763
XF2209	conserved hypothetical protein	AQ_1979	VIII.A	0.346	-0.83	-0.0535
XF2243	GTP binding protein	LEPA	IX	-0.674	-1.86	-0.881
XF2249	deoxyxylulose-5-phosphate synthase	DXS	I.B.10	-0.255	-1.48	0.15
XF2268	glycerol kinase	GLPK	I.B.10	0.177	-1.67	-0.199
XF2533	hypothetical protein		VIII.B	-0.177	-0.956	-0.065
XF2585	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	PCM	III.C.1	0.383	-1.26	-0.334
XF2693	hypothetical protein		VIII.B	-0.214	-1.09	-0.217
XF2732	hypothetical protein		VIII.B	-0.311	-1.25	0.136
XFa0008	conjugal transfer protein	traC	VI.B	-0.14	-0.915	-0.4
XFa0010	hypothetical protein		VIII.B	-0.447	-1.32	-0.176
XFa0013	conjugal transfer protein	traO	VI.B	-0.524	-1.3	-0.769
XFa0039	conjugal transfer protein	trbJ	VI.B	-0.109	-1.18	0.277
XF0005	DNA gyrase subunit B	GYRB	III.A.1	0.0255		-1.84
XF0033	PilE protein	pilE	IV.A.2	-0.229	-1.55	-1.22
XF0147	arginyl-tRNA synthetase	ARGS	III.B.4	0.22	-0.71	-1.05
XF0203	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl	ACCA	ILE	-0.335	-1.39	-1.01
VE0242	transferase subunit alpha	vorP		0.0272	0 147	_0.00
AF0243	nhosphomannose isomerase-GDP-mannose	yerr	VII.C	0.0273	0.147	-0.99
XF0259	pyrophosphorylase	XANB	I.B.11	0.487	-0.766	-1.32
XF0373	fimbrial assembly protein	PILQ	IV.D	0.209	-0.447	-1.31
XF0412	nitrate ABC transporter ATP-binding protein	NRTD	V.A.2	0.623	0.133	-1.17
XF0455	adenylosuccinate synthetase	PURA	II.B.1	0.758	0.233	-0.889
XF0470	conserved hypothetical protein	YJCC	VIII.A	3.51	2.33	-1.54
XF0614	hypothetical protein		VIII.B	-0.339	-0.795	-1.1
XF0675	conserved hypothetical protein	HI0457	VIII.A	1.72	1.66	-1.13
XF0901	polar amino acid transporter	YBEX	V.A.4	-0.0411	-0.373	-1.44
XF0944	ABC transporter ATP-binding protein	YJJK	V.A.7	0.237	-0.08	-1.03
XF1029	glutaryI-7-ACA acylase precursor	gaa	VII.C	0.0529	-0.932	-1.22
XF1046	outer membrane antigen	oma	IV.A.2	0.444	0.385	-1.0
XF1061	2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase	EDA	I.B.2	0.348	-0.657	-1.39
XF1062	6-phosphogluconate dehydratase	EDD	I.B.2	0.422	-0.835	-2.35
XF1078	DNA uptake protein	COMA	IX	1.71	1.73	-1.58
XF1109	hypothetical protein		VIII.B	1.75	2.06	-1.5
XF1197	ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	NRDB	II.B.3	-0.305	-0.733	-1.07
XF1226	hypothetical protein		VIII.B	0.0691	-0.717	-0.766
XF1269	lipoic acid synthetase	LIPA	II.D.3	0.0606	-0.381	-1.05
XF1316	ATP:GTP 3'-pyrophosphotranferase	RELA	I.D	1.56	1.77	-1.14
XF1319	hypothetical protein		VIII.B	-0.169	-0.719	-0.881
XF1381	DNA helicase	SC10A7.06c	III.A.3	-0.0878	-0.61	-1.56
XF1427	succinylornithine aminotransferase	ARGM	II.A.1	0.566	0.401	-1.32
XF1462	glucose/galactose transporter	GLUP	V.A.3	1.2	1.42	-1.16

XF1474	ABC transporter membrane protein	YNHC	V.A.7	0.00574	-0.522	-0.905
XF1504	conserved hypothetical protein	YICC	VIII.A	0.119	0.138	-1.01
XF1601	hypothetical protein		VIII.B	-0.126	-0.797	-0.893
XF1726	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol	LINC	VII.C	-0.0133	-0.724	-0.689
XF1744	oxidoreductase	None	IX	0.265	0.329	-1.35
XF1747	conserved hypothetical protein	p23	VIII.A	0.228	0.68	-1.08
XF1769	hypothetical protein		VIII.B	1.33	-1.18	-2.08
XF1944	peptidyl-dipeptidase	DCP	III.C.3	0.0875	0.168	-1.15
XF1970	3-oxoacyl-[ACP] synthase III	RP772	II.E	-0.219	0.171	-0.959
XF2094	multidrug-efflux transporter	ACRF	VII.C	0.113	0.0569	-1.23
XF2211	enolase-phosphatase	masA	II.A.2	-0.161	-2.11	-1.35
XF2301	polysaccharide export protein	MRP	V.A.7	-0.179		-2.47
XF2343	recombination protein N	RECN	III.A.3	0.49	-0.265	-1.38
XF2414	hypothetical protein		VIII.B	2.8	2.38	-1.54
XF2430	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	GUAB	II.B.1	0.274	-0.313	-1.24
XF2448	ABC transporter sugar-binding protein	malE	V.A.3	0.701	1.13	-1.75
XF2506	hypothetical protein		VIII.B	2.22	2.31	-1.03
XF2551	conserved hypothetical protein	At2g47390	VIII.A	0.924	0.566	-1.46
XF2607	ribonuclease E	RNE	III.B.3	-0.63	-0.457	-0.819
XF2616	hypothetical protein		VIII.B	0.265	0.129	-0.865
XF2233	DnaJ protein	DNAJ	III.C.2	-1.26	-1.85	-2.53
XE0049	biotin carboxylase subunit of acetyl CoA	ACCC	IIE	-0 208	-1 22	-1 03
XI 0043	carboxylase	7000	11.L	-0.200	-1.22	-1.00
XF0081	outer membrane usher protein precursor	FIMD	IV.D	-0.333	-1.2	-1.13
XF0167	conserved hypothetical protein	RP407	VIII.A	-0.0834	-0.964	-0.788
XF0184	conserved hypothetical protein	DR2142	VIII.A	-0.0724	-1.81	-1.2
XF0229	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	PANB	II.D.5	-0.303	-0.865	-0.912
XF0253	electron transfer flavoprotein alpha subunit	EIFA	1.C.3	-0.175	-1.27	-0.789
XF0274		РЕКА	I.C.4	-0.0146	-1.79	-1.46
XF0280		рерА	III.C.3	-0.262	-1.33	-0.855
XF0286	cell division inhibitor	sulA	V.B	-0.456	-1.39	-2.06
XF0292	aconitate hydratase 2	ACNB	I.C.7	-0.55	-1.7	-1.58
XF0381	A I P-dependent CIp protease subunit	CLPB	III.C.3	-0.48	-1.21	-0.893
XF0395	bacterioterritin	BER	V.A.4	-0.626	-1.52	-1.67
XF0445	prolyI-tRNA synthetase	PROS	III.B.4	-0.143	-1.39	-1.11
XF0550	conserved hypothetical protein	D 0400	VIII.A	-0.276	-2.21	-1.54
XF05/6		Rv0198c	III.C.1	0.192	-0.975	-0.803
XF0609	GDP-mannose 4,6 denydratase	GMD	I.B.11	-0.296	-0.995	-0.965
XF0610	UDP-giucose 4-epimerase	GALE	1.A.2	-0.692	-1.62	-1.08
XF0654	conserved hypothetical protein	1055	VIII.A	0.017	-1./1	-0.908
XF0669	pyruvate dehydrogenase	ACEE	1.0.6	-0.637	-1.//	-1.79
XF0781		estA	1.A.2	-0.103	-1.87	-1.01
XF0816	zinc protease	SC9B10.04	111.0.3	-0.108	-2.67	-2.42
XF0826	iruciose-bisphosphate aldolase	INONE	1.0.4	0.121	-1.5	-1.21
XF0978	neat snock protein G	ADCC	III.C.2	-0.548	-0.93	-1.01
XF0999		ARGG	II.A. I	-0.419	-0.991	-0.902
XF1001	acetyigiutamate kinase	argB	II.A. I	-0.348	-1.32	-1.3
	sugar ABC transporter ATP-binding protein	DH2153	v.A.3	0.0256	-1.38	-1.21
XF10/3	succinate denyarogenase iron-sultur protein	SDHB	I.U./	-0.458	-1.19	-0.837
XF1143	ATP synthase, beta chain	AIPD	I.C.8	-0.484	-1.63	-1.61
XF1145	AIP synthase, alpha chain		1.0.8	-0.478	-1.33	-0.93
XF1164	SUS ribosomai protein L5	RPLE	III.B.2	-0.225	-1.14	-0.952
XF1165	305 ribosomal protein S14	RPSN	III.B.2	-0.35	-1.02	-1.01
XF1196	ribonucieoside-diphosphate reductase alpha chain	NKDA	II.B.3	-0.473	-1.39	-1.24
XF1217	nypothetical protein		VIII.B	-0.347	-2.43	-2.13

XF1218	hypothetical protein		VIII.B	-0.385	-2.51	-2.01
XF1219	hypothetical protein		VIII.B	-0.657	-2.69	-2.76
XF1259	phosphoenolpyruvate synthase	PPSA	I.B.3	0.00465	-0.963	-1.04
XF1286	topoisomerase IV subunit B	PARE	III.A.1	-0.018	-0.947	-1.45
XF1298	electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	ETF-QO	I.C.3	0.0012	-0.925	-0.919
XF1468	phosphomannomutase	MRSA	I.B.11	0.0835	-0.918	-1.12
XF1476	ABC transporter membrane protein	SLR0074	V.A.7	-0.381	-1.04	-1.33
XF1477	conserved hypothetical protein	DR2094	VIII.A	-0.451	-1.56	-0.922
XF1548	dihydrolipoamide dehydrogenase	LPD	I.C.7	-0.256	-1.38	-0.968
XF1549	dihydrolipoamide S-succinyltransferase	SUCB	I.C.7	-0.606	-2.7	-1.74
XF1550	oxoglutarate dehydrogenase	ODHA	I.C.7	-0.533	-1.82	-1.72
XF1621	beta-lactamase-like protein	pbp	VII.C	-0.0666	-1.17	-1.07
XF1632	twitching motility protein	pilU	IV.D	-0.18	-1.46	-0.747
XF1633	twitching motility protein	PILT	IV.D	-0.172	-1.18	-0.849
XF1840	conserved hypothetical protein	zm10orf9	VIII.A	-1.03	-1.12	-1.37
XF1887	hypothetical protein		VIII.B	-0.352	-1.12	-1.17
XF1975	bifunctional purine biosynthesis protein	PURH	II.B.1	-0.262	-1.25	-1.25
XF2111	hypothetical protein		VIII.B	-0.168	-0.933	-0.809
XF2165	transcription-related protein	TEX	I.D	-0.393	-1.81	-1.76
XF2174	thioredoxin	YBBN	II.D.10	-0.604	-1.72	-1.61
XF2176	leucyl-tRNA synthetase	LEUS	III.B.4	-0.196	-1.7	-1.46
XF2205	conserved hypothetical protein	AIP2	VIII.A	0.0884	-0.937	-0.897
XF2207	cationic amino acid transporter	SC1C3.02	V.A.1	0.178	-1.26	-0.841
XF2237	conserved hypothetical protein		VIII.A	-0.21	-1.2	-0.729
XF2241	periplasmic protease	mucD	III.C.3	-0.631	-2.01	-1.83
XF2244	signal peptidase I	LEPB	III.C.1	-0.725	-2.15	-1.04
XF2246	ribonuclease III	RNC	III.B.6	-0.321	-1.58	-0.902
XF2385	acriflavin resistance protein D	YEGN	VII.C	-0.669	-1.42	-1.31
XF2418	isoleucyl-tRNA synthetase	ILES	III.B.4	-0.279	-1.71	-1.22
XF2444	pheromone shutdown protein	traB	VI.B	-0.539	-1.32	-1.25
XF2453	conserved hypothetical protein	YCIL	VIII.A	-0.155	-1.27	-0.841
XF2544	pilus biogenesis protein	PILB	IV.D	-0.523	-1.66	-1.22
XF2547	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	SUCC	I.C.7	-0.465	-2.07	-1.62
XF2586	outer membrane export factor	TOLC	VII.C	0.149	-2.08	-1.12
XF2699	transcription termination factor Rho	RHO	III.B.5	-0.482	-1.86	-1.2
XF2713	conserved hypothetical protein	r4	VIII.A	-0.35	-2.25	-2.02
XFa0014	conjugal transfer protein	traF	VI.B	-0.461	-0.964	-1.09
XFa0017	hypothetical protein		VIII.B	-0.448	-0.855	-0.869
XF0615	60kDa chaperonin	MOPA	III.C.2	-0.73	-3.07	-3.26
XF0616	10kDa chaperonin	GROES	III.C.2	-0.848	-3.19	-2.74
XF0768	conserved hypothetical protein		VIII.A	-1.36	-1.11	-1.19
XF1216	colicin V secretion protein	CVAA	VII.C	-0.905	-1.53	-1.13
XF2234	low molecular weight heat shock protein	HSPA	VII.G	-1.02	-2.18	-2.15
XF2339	DnaJ protein	DNAJ	III.C.2	-0.783	-1.23	-1.6
XF2340	DnaK protein	DNAK	III.C.2	-1.34	-2.89	-2.83
XF2341	heat shock protein GrpE	GRPE	III.C.2	-1.19	-3.32	-3.74
XF2548	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	SUCD	I.C.7	-0.762	-2.26	-2.13

ANEXO 3

Artigos publicados deste trabalho

- Artigo 1 DA SILVA NETO, J. F.; KOIDE, T.; GOMES, S. L.; MARQUES, M. V. The single extracytoplasmic-function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism. J. Bacteriol., v. 189, p. 551-560, 2007.
- Artigo 2 DA SILVA NETO, J. F.; KOIDE, T.; ABE, C. M.; GOMES, S. L.; MARQUES, M. V. Role of σ⁵⁴ in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. Arch. Microbiol., No prelo.