

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/55148

IB/ 81962

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Patricia Pereira Coltri

**Expressão de genes de *Xylella fastidiosa* sob
diferentes condições de crescimento**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Patricia Pereira Coltri
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Genética e Biologia Molecular –
Área de Concentração Genética de Microrganismos.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

2003

UNIDADE IB 102
Nº CHAMADA
11 Unicamp
Coltri
V
TOMEO NO. 55748
PROC. 16 24103
C
PREÇO
DATA 07/08/03
Nº CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C722e

Coltri, Patricia Pereira

Expressão de genes de *Xylella fastidiosa* sob diferentes condições de crescimento / Patricia Pereira Coltri. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Yoko Bomura Rosato

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1.Regulação. 2.Fosfato. 3.Transcrição genética--Pesquisa--Metodologia.

I.Rosato, Yoko Bomura. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.Título.

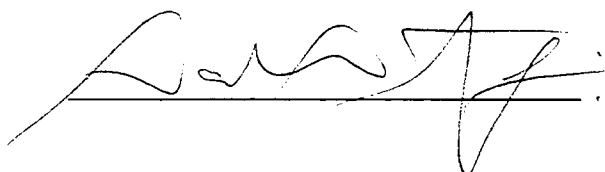
Campinas, 26 de maio de 2003.

BANCA EXAMINADORA:

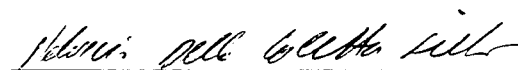
Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato



Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



Dr. Helvécio Della Colleta Filho



Dra. Valéria Maia de Oliveira

Meus Agradecimentos

À Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato pela orientação e amizade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio, Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira e Dra. Isabel Rodrigues Gerhardt pelas sugestões e críticas na pré-banca.

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, Dr. Helvécio Della Colleta Filho e Dra. Valéria Maia de Oliveira pela participação na banca.

Aos meus amigos do Aconchego, que ajudaram a fazer do laboratório um lugar tão especial, Ed, San, (Ori)Ângela, Fran, Cene, TE e Marcelo.

Aos colegas do laboratório de genética de plantas do CBMEG pela ajuda, Dani, Isa, Alba, Mário, Silvia, Letícia e Paulo.

À Dani Cabral, Lucy, Débora, Suzy, Luciana, Milena e Ana Claudia, pela amizade e apoio.

Ao técnico Wilson pela ajuda no laboratório.

Às secretárias Andressa, Sandra e Tânia.

Ao Henrique que, mesmo longe, sempre esteve tão próximo para ajudar.

Aos meus amigos sempre presentes, Cíntia, Renato, Erick, Kubota, Aluana, Márcio, Ju, Yu Jie, Gi, Prianda, Rodrigo Ei, Rafael Raimundo, Rafael, Sérgio.

Aos meus amigos Laísa, Mauro, Fábio, pela convivência, amizade e incentivo.

Ao Paulo (Miúdo), pela compreensão e pelo apoio, e também por me incentivar sempre.

À minha “ermã” Pri, pela amizade e compreensão, em todos os momentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus pais, Maria Inês e Cláudio, por terem me ensinado a sonhar e por terem acreditado nos meus sonhos, sempre.

Índice

Resumo	1
Summary	3
1.Introdução	5
2. Objetivos	8
3. Revisão de Literatura	
3.1. <i>Xylella fastidiosa</i>	9
3.2. Genoma de <i>X. fastidiosa</i> 9a5c	14
3.3. Estudo comparativo de genomas de <i>X. fastidiosa</i> de diferentes hospedeiros	22
3.4. Clonagem e expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	24
4. Material e Métodos	
4.1. Linhagens de bactérias utilizadas e meios de cultura	28
4.2. Preparação do extrato de plantas	28
4.3. Desenho de <i>primers</i>	29
4.4. PCR (Polymerase Chain Reaction) e clonagem	30
4.5. Cultivo de <i>X. fastidiosa</i> e <i>E. coli</i> em diferentes condições	
4.5.1. <i>X. fastidiosa</i>	31
4.5.2. <i>E. coli</i> recombinantes	32
4.6. Extração de RNA	33
4.7. RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)	33
4.8. Clonagem em vetor de expressão	34
4.8.1. Expressão heteróloga	35
4.9. SDS-PAGE	35
4.10. Western blot	36
5. Resultados	
5.1. Análise da transcrição em <i>X. fastidiosa</i>	38
5.1.1. Transcrição de <i>phoR</i> sob diferentes níveis de PO ₄	41
5.1.2. Transcrição de outros genes do regulon <i>pho</i> sob diferentes níveis de PO ₄	43
5.1.3. Transcrição de <i>htpX</i> sob diferentes condições de meio e temperatura	46
5.2. Amplificação das ORFs de <i>X. fastidiosa</i> com <i>primers</i> da série TR e clonagem em <i>E. coli</i>	46
5.3. Transcrição em <i>E. coli</i>	50
5.3.1. Transcrição de <i>htpX</i> em <i>E. coli</i> sob diferentes temperaturas	55
5.4. Clonagem em vetor pET 32 Xa/LIC	56
5.4.1. Expressão e SDS-PAGE	56
5.4.2. Western blot	59
6. Discussão	61
7. Considerações Finais	70
8. Referências Bibliográficas	72

RESUMO

Xyllela fastidiosa é um fitopatógeno Gram-negativo limitado ao xilema, responsável por perdas econômicas em diversas culturas em regiões de clima tropical e subtropical, principalmente nas Américas. No Brasil, *X. fastidiosa* tem representado um problema sério para a cultura de citros, já que é responsável pela clorose variegada dos citros (CVC). O genoma desta bactéria foi completamente sequenciado em 2000 e revelou ORFs de grande importância para compreensão do mecanismo de interação deste patógeno com o ambiente. No presente trabalho foram selecionadas cinco ORFs (*open reading frames*) relacionadas com a interação da bactéria com o ambiente, de acordo com a anotação do genoma. A transcrição destes genes foi analisada por meio de reações de RT-PCR, partindo de RNAs extraídos da bactéria submetida a diferentes condições de cultura. Além disso, foi utilizado um sistema alternativo para estudo da transcrição, *Escherichia coli*. As ORFs, com suas respectivas regiões regulatórias 5', foram clonadas em *E. coli* DH5 α e os recombinantes foram submetidos a diferentes condições de cultura. De forma geral, os genes foram transcritos em meios mais ricos. A transcrição de *phoR* (XF 2592), proteína sensora de níveis alterados de fosfato na célula, foi observada sob diferentes concentrações deste componente, tanto em *X. fastidiosa* como em *E. coli*, indicando que este gene, ao contrário do previsto, pode não atuar diretamente na transdução dos sinais de fosfato na célula. Outros genes relacionados ao regulon *pho* também foram testados e não apresentaram diferenças na transcrição sob diferentes níveis de fosfato. O gene *htpX* (XF 2625) foi transcrito sob maior temperatura de incubação em meio XDM, confirmando sua participação na resposta de choque térmico em *X. fastidiosa*. Além disso, este gene foi detectado de forma constitutiva em meios ricos, tanto em *X. fastidiosa* como em *E. coli*. Embora os genes *xpsL* e *xpsE* pertençam ao mesmo operon, relacionado ao sistema de

secreção do tipo II, foram observadas diferenças com relação a transcrição. *xpsL* (XF 1524) foi observado em meios mais ricos, tanto em *X. fastidiosa* como em *E. coli*. O transcrito *xpsE* (XF 1517), por outro lado, não pode ser detectado em *E. coli* possivelmente por necessitar de outros genes, nativos de *X. fastidiosa*, para sua ativação. O transcrito *pilS* (XF 2546), envolvido com a biossíntese do pili, foi observado em meios mais ricos em ambas as bactérias. Em uma segunda etapa do trabalho, as ORFs selecionadas foram clonadas no vetor de expressão pET 32 Xa/LIC, com o objetivo de expressar as respectivas proteínas em *E. coli*. Os resultados de SDS-PAGE indicaram a expressão das proteínas XpsL, PhoR e HtpX, que foram confirmadas por Western blot utilizando anticorpo anti-His tag.

SUMMARY

Xylella fastidiosa is a Gram-negative bacterium and was the first phytopathogen to be completely sequenced. It is the causal agent of citrus variegated chlorosis (CVC), which has led to several economic losses in Brazil. The genome annotation revealed some genes that can give important insights about plant-bacteria interactions. In order to understand the effect of different environmental conditions, five open reading frames (ORFs) were selected in the present work. Transcription analysis of these genes was assessed by RT-PCR using RNA extracted from *X. fastidiosa* grown in different culture conditions. Additionally, these genes were cloned into *Escherichia coli* DH5 α and the transcription profile of the five genes was analyzed in similar conditions. The *phoR* (XF 2592) transcript, which encodes a phosphate sensor protein, was detected in all conditions, including different phosphate concentrations. Unexpectedly, these results suggest that *phoR* is not responsible for signal transduction of phosphate into the cell. The transcription analysis of some other *pho*-related genes confirmed that this system is not under the regulation of different levels of phosphate in *X. fastidiosa*. The gene *htpX* (XF 2625) was detected when *X. fastidiosa* was submitted to higher temperatures, indicating a relationship of this gene with the heat shock response. This transcript was also constitutively transcribed in rich media, in *X. fastidiosa* and in *E. coli*. The *xps* genes (*xpsL* and *xpsE*), related with the type II secretion system, showed differences in the transcription profile even though they belong to the same operon. *xpsL* (XF 1524) transcript was detected in rich media in both *X. fastidiosa* and *E. coli*. However, the *xpsE* (XF 1517) transcript was not observed in *E. coli*, indicating that other genes, present in *X. fastidiosa*, may be necessary to activate its transcription. *pilS* (XF 2546), a sensor protein involved in the fimbriae synthesis, was

transcribed in both hosts when rich media was used. In the second part of the project, the ORFs were cloned into pET 32 Xa/LIC expression vector. The SDS-PAGE revealed that three proteins, XpsL, PhoR and HtpX, were correctly expressed as evaluated by molecular weight and Western blot assays using anti-His tag serum.

1. INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa, limitada ao xilema, e responsável por grandes perdas econômicas em diversas culturas nas regiões de clima tropical e subtropical. O fitopatógeno foi associado ao mal de Pierce na videira em 1973 e similaridades na morfologia celular o aproximou das Rickettsiaceae (Goheen *et al.*, 1973). No entanto, estudos posteriores revelaram que este patógeno possuía características bem diferenciadas, como a composição de GC do genoma, sorologia, composição de ácidos graxos e dados de hibridização DNA:DNA (Hopkins, 1989). Análises do gene ribossomal 16S, por fim, confirmaram o agrupamento dos isolados em uma nova espécie, *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987).

Entre os hospedeiros da bactéria estão plantas de mais de 28 famílias de mono- e dicotiledôneas, sendo muitas destas de grande importância econômica. Nos Estados Unidos, a escaldadura da folha da videira (mal de Pierce), a doença do pessegueiro (“phony peach”) e a requeima de folhas de citros são observados desde o século 19 (Hopkins, 1988). No Brasil, a *Xylella* tem representado um grave problema principalmente na citricultura, causando a CVC (clorose variegada dos citros), também conhecida como “amarelinho” devido às pontuações amareladas que provoca nas folhas. Além disso, os frutos também se apresentam endurecidos e com tamanho reduzido, o que prejudica sua comercialização e processamento (Queiroz-Voltan & Paradela-Filho, 1999). O envolvimento da bactéria com citros, no Brasil, foi constatado em 1987 (Rossetti *et al.*, 1990), e atualmente cerca de 36% dos laranjais no estado de São Paulo e Triângulo Mineiro estão infectados, de acordo com o Fundecitrus (www.fundecitrus.com.br).

X. fastidiosa é transmitida por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) e atualmente os métodos de controle concentram-se no controle químico dos insetos-vetores, na poda de plantas doentes e na utilização de mudas sadias (www.fundecitrus.com.br). O mecanismo de patogenicidade ainda não é esclarecido, mas a maior parte dos autores sugere que a bactéria, uma vez no xilema, cause a oclusão dos vasos impedindo a passagem de água e nutrientes para as partes superiores e levando a planta a um estado de estresse hídrico (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Outra hipótese sugere que ocorre uma competição por nutrientes entre a planta e a bactéria, levando ao surgimento dos sintomas (Machado *et al.*, 2001).

X. fastidiosa foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma seqüenciado, em 2000 (Simpson *et al.*). A sequência do genoma, de cerca de 2,7 Mb, foi determinada assim como a de dois plasmídios nativos, pXF51 e pXF1,3. Foram identificados 2.838 genes, dos quais 1.283 (46%) possuem função biológica conhecida. Alguns autores sugerem que *X. fastidiosa* seja um “patógeno mínimo”, devido ao tamanho do genoma (Dow & Daniels, 2000; Van Sluys *et al.*, 2002). Por consequência, *X. fastidiosa* não possui certas vias metabólicas, o que impede, de certa maneira, a sua rápida adaptação a ambientes diferentes (Van Sluys *et al.*, 2002). Entre os genes potencialmente envolvidos na interação com hospedeiro e adaptação a diferentes condições ambientais estão as fímbrias e adesinas, proteínas de choque térmico, proteínas relacionadas a sistemas de secreção e sistemas sensor-efetor (Dow & Daniels, 2000).

Sistemas de transdução de sinal são bastante importantes na adaptação da bactéria a diferentes condições, como a presença da planta hospedeira ou do inseto-vetor. O metabolismo de fosfato e a biogênese do pili, em *X. fastidiosa*, são regulados por sistemas de transdução com dois componentes, sensor e efetor. A regulação da atividade das

proteínas celulares, por meio de modulação na transcrição, tradução ou pós-tradução, também é essencial para que a célula responda adequadamente a estímulos externos. A presença de proteases, como as proteínas de choque térmico, é importante para degradação de proteínas anormais, produzidas sob condições de estresse para a célula. Além destes, alguns outros genes também podem apresentar papel importante na interação com o ambiente. Entre estes, estão componentes do sistema de secreção tipo II, bastante difundido entre bactérias Gram-negativas para secreção de enzimas extracelulares, responsáveis pela degradação de tecidos vegetais (Salmond, 1994; Dow & Daniels, 2000).

O estudo funcional dos genes identificados em *X. fastidiosa* é de grande importância principalmente para uma melhor compreensão de processos celulares, metabólicos, mecanismos de adaptação e interação em diferentes condições. No presente trabalho foram selecionadas 5 ORFs (*open reading frames*) da linhagem de *X. fastidiosa* isolada de citros. Para a seleção foram consideradas características como a interação com o ambiente e com o hospedeiro. As ORFs XF 1524 (*xpsL*), de 1,1 kb e XF 1517 (*xpsE*), de 1,7 kb, pertencem ao mesmo cluster de genes (*xps*), relacionados ao sistema de secreção do tipo II. XF 2592 (*phoR*), de 1,3 kb, e XF 2546 (*pilS*), de 1,8 kb, são proteínas sensoras, histidina-quinases, componentes de sistemas de transdução de sinal. *phoR* está relacionada à níveis alterados de fosfato na célula e *pilS* está envolvido com a biossíntese do pili. XF 2625 (*htpX*), de 870 pb, por sua vez, é uma proteína de choque térmico.

Em uma primeira etapa foi realizado estudo da transcrição destes genes, por meio de RT-PCR. Uma outra etapa envolveu a clonagem destas ORFs em *E. coli* para realizar a super-expressão das proteínas em sistema heterólogo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos o estudo da transcrição e da expressão heteróloga de alguns genes de *X. fastidiosa*. Foram selecionados genes relacionados a interação com hospedeiro e com meio externo, de acordo com os dados de anotação do genoma (Simpson *et al.*, 2000 e <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf>).

O projeto foi dividido em duas partes. Na primeira, foi estudada a transcrição dos genes selecionados em dois sistemas: *X. fastidiosa* e *E. coli*. Na segunda parte, foi verificada a expressão das proteínas correspondentes às ORFs selecionadas em sistema heterólogo (*E. coli*).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Xylella fastidiosa*

Em 1880 a plantação de videira da Califórnia e sudoeste dos Estados Unidos sofreu grandes perdas, devido a uma doença desconhecida. Alguns anos mais tarde outras culturas, como a de pêsego, foram afetadas por uma doença que diminuía a produção de frutos e o vigor das plantas. Embora o agente causal fosse desconhecido, acreditava-se que estas doenças eram causadas por um vírus restrito ao xilema, já que os sintomas indicavam oclusão vascular na planta (Hopkins & Purcell, 2002). Mas foi somente em 1973 que uma bactéria foi associada ao mal de Pierce na videira (Goheen *et al.*, 1973; Hopkins & Mollenhauer, 1973). O patógeno foi inicialmente agrupado entre as Rickettsiaceae, devido a similaridades na morfologia e ultraestrutura celular. Os estudos de composição do DNA, entretanto, revelaram diferenças entre os microrganismos já que as Rickettsia apresentavam cerca de 38,5 mol%G+C e, o “novo patógeno” tinha entre 49,5 e 53,1 mol%G+C. Assim, a bactéria responsável pelo mal de Pierce na videira, pela doença do pessegueiro e por outras doenças em diversas plantas, passou a ser referida como *Xylella fastidiosa* (Hopkins, 1989).

Xylella fastidiosa é um patógeno habitante de xilema e de crescimento fastidioso e lento. É uma bactéria Gram-negativa, tem forma de bastonete e foi agrupada às eubactérias do subgrupo γ por Wells *et al.* (1987). Embora seja um patógeno bastante similar às bactérias do gênero *Xanthomonas* (também incluídas no subgrupo γ), diferenças fenotípicas e genotípicas justificaram a separação dos gêneros. *X. fastidiosa* é aeróbica, não possui flagelos e não é móvel. As células apresentam fibrilas que podem funcionar como fímbrias

e eventualmente apresentar alguma função na interação com o hospedeiro (Wells *et al.*, 1987).

Entre os hospedeiros deste fitopatógeno estão plantas de mais de 28 famílias de mono- e dicotiledôneas, sendo muitas destas de grande importância econômica. Além da videira e do pessegueiro, *X. fastidiosa* também causa doença em alfafa, amêndoa, ameixa, elmo, carvalho, vinca, citros e café. Duas espécies de gramíneas (*Echinochloa cruz-galli* e *Artemisia douglasiana*) e o “blackberry” (*Rubus procerus*) também são hospedeiros de *X. fastidiosa*, entretanto, não apresentam sintomas e desta forma são plantas consideradas “reservatórios” da bactéria (Hopkins & Purcell, 2002). As plantas ornamentais também podem ser afetadas e um problema diagnosticado em 1994 no sudeste da Califórnia foi a requeima de espiroleira (Purcell *et al.*, 1999).

Os sintomas causados por *X. fastidiosa* nas plantas infectadas incluem um grande número de alterações dependentes da planta hospedeira. Estes incluem a queima do bordo de folhas, a queda das folhas, a morte dos ponteiros e um declínio no vigor da planta. Em alguns casos a doença causa diminuição na quantidade e no tamanho dos frutos e também a diminuição da distância dos internós nos ramos. Estes sintomas sugerem que o mecanismo envolvido na doença está relacionado com a disfunção do transporte de água na planta. De fato, células bacterianas, tiloses e goma foram encontradas bloqueando os vasos do xilema de plantas infectadas (Mircetich *et al.*, 1976; Mollenhauer & Hopkins, 1976). No entanto, outras hipóteses tem sido consideradas, como a produção de fitotoxinas pela bactéria (Mircetich *et al.*, 1976; Lee *et al.*, 1982) e o desbalanço hormonal, que levaria a níveis alterados de reguladores de crescimento (French *et al.*, 1978). Uma outra hipótese considera que a competição por nutrientes entre a bactéria e a planta pode levar a distúrbios nutricionais, acarretando no aparecimento dos sintomas (Machado *et al.*, 2001). De acordo

com Hopkins (1989) o aparecimento da doença estaria relacionado ao estado de estresse da planta. A presença de outras doenças, a super-produção de frutos, a senescência e o ambiente seco são condições capazes de provocar estresse na planta aumentando as chances da doença se manifestar (Hopkins, 1989).

A transmissão de *X. fastidiosa* ocorre por cigarrinhas (Homóptera: Cicadellidae). A bactéria coloniza o cibário do inseto e se propaga, mas não circula pelo vetor. Quando o inseto se alimenta no xilema, a força da sucção provavelmente desaloja algumas células bacterianas, que são expelidas para o xilema da planta hospedeira. Uma vez no xilema, a bactéria forma agregados conectados por fibras extracelulares (similar ao glicocálix). A perda da característica de agregação resulta em atenuação da virulência, sugerindo que há uma correlação entre as fibras extracelulares e a patogenicidade de *X. fastidiosa* (Hopkins, 1989). Estas fibras extracelulares seriam responsáveis pela aderência da bactéria aos vasos da planta, além de participarem também na captura de íons e no armazenamento de enzimas digestivas próprias para obter nutrientes da planta (Purcell & Hopkins, 1996; Hopkins, 1989). Embora o xilema seja um ambiente nutricionalmente pobre, contém uma grande variedade de aminoácidos monoméricos, ácidos orgânicos e íons, bastante utilizados por bactérias limitadas ao xilema (Purcell & Hopkins, 1996).

X. fastidiosa ocorre principalmente em áreas de clima tropical ou subtropical, sendo raramente encontrada fora das Américas. A incidência da bactéria diminui gradualmente conforme diminui a temperatura. Registros isolados foram observados apenas na pereira em Taiwan (Leu & Su, 1993) e em ameixeira na Índia (Jindal & Sharma, 1987). A doença mal de Pierce, da videira, já foi observada na Califórnia, Costa Rica, México, Venezuela, América Central e na região norte da América do Sul. A escaldadura da folha de ameixeira é relatada no sudeste dos Estados Unidos, Argentina, Brasil e Paraguai (Hopkins, 1989).

No Brasil o maior impacto da *X. fastidiosa* certamente foi causado nas plantações de citros, principalmente de laranja doce (Rossetti *et al.*, 1990; Leite & Leite, 1991; Chang *et al.*, 1993). A bactéria é responsável pela clorose variegada dos citros (CVC), também conhecida como “amarelinho” devido às pontuações amareladas que provoca nas folhas. Em 1996, cerca de 26% das plantas de citros de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro estavam infectadas com a doença. A estatística mais recente, de 2001, aponta cerca de 36% de plantas infectadas, de acordo com o Fundecitrus (www.fundecitrus.com.br). Plantas cítricas com sintomas da doença já foram encontradas nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Sergipe e no Distrito Federal (Tubelis *et al.*, 1993). Além de folhas com pontuações amareladas, os frutos também são atingidos, ficando endurecidos e com tamanho reduzido, o que prejudica sua comercialização e processamento (Queiroz-Voltan & Paradela-Filho, 1999). A requeima dos citros também é observada há mais de 100 anos na Florida (Estados Unidos) onde leva a perdas anuais de 10% a 20% da produção de citros (Hopkins, 1988). Na Argentina, ela é identificada como “pecosita” e é provavelmente uma das origens da CVC brasileira (Hopkins & Purcell, 2002).

Além da CVC, no Brasil *X. fastidiosa* também está associada com o depauperamento de plantas de cafeeiro (Beretta *et al.*, 1996; Paradela-Filho *et al.*, 1997). A presença da bactéria em cafeeiros foi reportada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Beretta *et al.*, 1996). Foram realizados, desde então, muitos estudos sobre a diversidade genética das populações de *X. fastidiosa* existentes no país bem como a epidemiologia, métodos de detecção rápida e as relações genéticas entre as bactérias de diferentes hospedeiros. Os dados revelaram que as linhagens isoladas de citros e de café são bastante similares, indicando que a origem do patógeno afetando as duas culturas pode ser

comum (Chang *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1994; Pooler & Hartung, 1995; Rosato *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 2001).

A relação patógeno-hospedeiro é complexa em *X. fastidiosa*. Aparentemente há pouca especificidade de hospedeiro, de maneira que isolados do mal de Pierce da videira podem colonizar uma série de outras plantas, induzindo ou não o aparecimento de sintomas. Isolados de *X. fastidiosa* de videira com o mal de Pierce constituem um grupo que possui uma ampla gama de plantas hospedeiras (Hopkins, 1989). No entanto, isolados de espirradeira ou oleander não causaram doença em videira, o que sugere algum grau de especificidade neste caso. Os testes de patogenicidade em diversos hospedeiros tem mostrado que as linhagens de videira, alfafa e amêndoa são similares enquanto as do pessegueiro e ameixeira são distintas. Apesar da similaridade entre as linhagens do primeiro grupo, é interessante notar que os sintomas em videira são causados exclusivamente por isolados do mesmo hospedeiro e não de outros. A indução de sintomas em fumo (*Nicotiana tabacum*), utilizando-se *X. fastidiosa* de citros, apresenta-se como um novo modelo experimental para testes de patogenicidade (Lopes *et al.*, 2000). Do ponto de vista nutricional, os isolados foram caracterizados também em dois grupos principais: aqueles que crescem em meio PD3 e PW, que inclui os isolados de videira, e um segundo grupo, que cresce somente em meio PW, e que compreende os isolados do pessegueiro (Kamper *et al.*, 1985). Esses agrupamentos foram concordantes também com a caracterização genética. Os isolados de videira foram caracterizados como geneticamente uniformes e distintos dos isolados do pessegueiro e ameixeira (Leite *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1994) que por sua vez apresentaram maior variabilidade. Isolados de *X. fastidiosa* associados à CVC e cafeeiro aparentemente estão mais próximos aos do mal de Pierce da videira (Leite *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1994). Recentemente uma nova

subespécie, proveniente de pêra, foi caracterizada por diferentes marcadores moleculares e descrita por Mehta *et al.* (2001). De acordo com Hendson *et al.* (2001) a espécie *X. fastidiosa* pode ser subdividida de acordo com a patogenicidade e o hospedeiro, criando assim “patovares” distintos na espécie.

3.2. Genoma de *X. fastidiosa* 9a5c

A linhagem 9a5c de *X. fastidiosa*, isolada de citros infectado no estado de São Paulo por Chang *et al.* (1993), foi a primeira bactéria fitopatogênica a ter o genoma sequenciado (Simpson *et al.*, 2000). A sequência do genoma, de cerca de 2,7 Mb, foi determinada assim como a de dois plasmídios nativos, pXF51 e pXF1,3. Foram identificados 2.838 genes, dos quais 1.283 (46%) possuem função biológica conhecida. Outros 310 apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas conservadas e 1.083 não apresentaram correspondência no banco de dados (Simpson *et al.*, 2000). De acordo com a anotação do genoma, estes genes estão divididos em 9 categorias funcionais. Entre estas estão os processos de metabolismo celular (DNA, RNA), transporte, biossíntese de moléculas pequenas, de aminoácidos, de nucleotídeos e patogenicidade, virulência e adaptação (Simpson *et al.*, 2000).

Os genes envolvidos com patogenicidade são o alvo no estudo de bactérias patogênicas e especialmente no caso de *X. fastidiosa* essa característica foi uma das mais importantes para a seleção da linhagem a ser sequenciada. Alguns grupos de genes comuns entre fitopatógenos Gram-negativos, entretanto, não foram encontrados no genoma de *X. fastidiosa*, como os *avr* (avirulence) e *hrp* (hypersensitivity and pathogenicity response). Os genes *avr* são responsáveis pela especificidade raça-cultivar e os genes *hrp* controlam duas

características na planta: a resposta de hipersensibilidade, que provoca necrose rápida do tecido de plantas resistentes ou incompatíveis, e a reação de patogenicidade, com desenvolvimento de sintomas em geral mais demorados (Bonas, 1994; Leach & White, 1996). Durante a interação planta-patógeno a resistência é controlada pelos genes “R” de resistência no hospedeiro, que podem ser ativados pelos produtos de *avr*, liberados pelo patógeno. Estes produtos entram em contato com o gene de resistência através do sistema *hrp*, que os “entrega” na célula da planta (Lindgren, 1997). A ausência destes genes no genoma de *X. fastidiosa* sugere que outros mecanismos de interação entre a planta e a bactéria sejam utilizados.

Assim, entre os possíveis candidatos, estão componentes do sistema *rpf* (regulation of pathogenicity factors), de síntese de goma xantana (operon gum), biossíntese de fímbrias e adesinas, e sistemas sensor-regulador (Dow & Daniels, 2000). Os genes que controlam a síntese de um exopolissacarídeo (operon *gum*), bem como o cluster *rpf* (regulation of pathogenicity factors), foram descritos em *Xanthomonas campestris*. A síntese de exopolissacarídeos (EPS) é comumente encontrada em bactérias que interagem com plantas, como *Rhizobium* e fitopatógenos e, em *X. fastidiosa* este EPS pode ser parte constituinte da matriz extracelular, relacionado à adesão entre células bacterianas. Os EPS são polímeros de carboidratos que podem ficar associados com a parede celular formando uma cápsula ou podem ser liberados no meio extracelular. Em bactérias do gênero *Xanthomonas*, o EPS é produzido comercialmente e designado goma xantana. O operon *gum*, responsável pela síntese dessa goma, localiza-se em um cluster longo, de cerca de 16 kb (para uma revisão ver Leigh & Coplin, 1992), contendo vários genes, de *gumB* à *gumM*. Mutantes defectivos na síntese da goma foram isolados, levando a identificação de genes que funcionam em passos específicos da síntese, bem como na sua regulação. A regulação

desses genes tem se mostrado bastante complexa e pode ou não ser coordenadamente controlada com outros fatores de patogenicidade. Esses genes apresentaram reguladores do tipo sensor-efetor e controlam a síntese da goma bem como de enzimas extracelulares e patogenicidade. O sistema parece também apresentar, em separado, função regulatória negativa. Tang *et al.* (1990) clonaram um locus que, quando em multicópia, apresentava repressão coordenada da goma e de enzimas extracelulares. Os dois sistemas apresentam algumas diferenças com os correspondentes homólogos encontrados no genoma de *X. fastidiosa*. Dentre os genes responsáveis pela produção de goma xantana, *X. fastidiosa* apresenta ausência de alguns, dentre os quais estão os responsáveis pela adição da manose terminal, acetilação e piruvatação (Simpson *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2001). Dessa forma, a goma “fastidiana”, produzida por *X. fastidiosa*, é menos ramificada e não possui as decorações de radicais acetato e piruvato, de forma que as propriedades de adesão e capacidade viscosificante ficam prejudicadas (da Silva *et al.*, 2001). Também o sistema *rpf* não está representado integralmente no genoma, e a ausência dos correspondentes *rpfD* e *rpfE* foi observada (Simpson *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001).

Desta forma, a interação de *X. fastidiosa* com seus hospedeiros pode estar associada a processos alternativos de patogenicidade. Da mesma maneira, é importante o estudo das reações de *X. fastidiosa* a diferentes condições ambientais, podendo fornecer bons indícios sobre a sua interação com o ambiente e com as plantas colonizadas. Considerando que esta é uma bactéria limitada ao xilema, e que, para sua sobrevivência, deve permanecer nestes vasos, a aderência é uma característica importante, já que a bactéria não pode ser arrastada pelo fluxo do xilema. As fímbrias e adesinas atuam exatamente neste ponto, promovendo aderência das células bacterianas ao tecido vascular da planta e também ao trato digestivo do inseto-vetor. Além disso, as fímbrias podem atuar na interação entre células bacterianas,

levando a agregação e a oclusão de vasos, e também na motilidade das células pelos vasos (Lambais *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001), fator determinante na colonização (Hopkins, 1989). A ligação de adesinas pode desencadear uma cascata de sinais, tanto do patógeno como da planta, levando ao sucesso ou insucesso da invasão. As adesinas são em geral organizadas em apêndices denominados de fímbria ou pili que se estendem da parede bacteriana ou podem permanecer associadas com a superfície celular. Tanto as adesinas como as estruturas relacionadas (fímbrias) estão envolvidas com um grande número de doenças, principalmente com bactérias que infectam células animais (Soto & Hultgren, 1999). No genoma de *X. fastidiosa* foram encontrados 26 genes codificando proteínas responsáveis pela biogênese e função de fímbrias, além de um sistema isolado, sensor-efetor (*pilS/pilR*) que pode atuar na formação das fímbrias. Além das possíveis fímbrias foram também encontradas três adesinas putativas (Simpson *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001).

Em patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, o pili é fator determinante para o sucesso da infecção, já que está envolvido na adesão ao epitélio celular, primeiro passo na interação com hospedeiro animal (Hobbs *et al.*, 1993; Ethier & Boyd, 2000). Além disso, estes apêndices celulares também são importantes na motilidade celular, na captação de DNA (competência natural) e na agregação celular. A formação de pili ou fímbria depende de estímulo, reconhecido pelo sistema sensor-efetor (*pilS/pilR*), que, uma vez ativado, é capaz de induzir a produção de pilina (PilA) (Wall & Kaiser, 1999; Ethier & Boyd, 2000; Koebnik, 2001; Mattick, 2002).

A regulação da transcrição por meio de sistemas sensor-efetor é um mecanismo bastante utilizado por bactérias para detectar estímulos ambientais. Alterações de meio, nutrientes, temperatura são capazes de regular determinadas proteínas transmembranares,

geralmente por fosforilação, a qual em seguida pode ativar outra(s) proteína(s) no citoplasma. Esta segunda proteína pode então funcionar como reguladora da expressão de determinados genes, possivelmente envolvidos com a adaptação à condição em que a bactéria se encontra. A boa adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes ambientes pode ser devido à grande quantidade de sistemas de transdução de sinal que esta bactéria apresenta (Rodrigue *et al.*, 2000). Sistemas de dois componentes, dessa maneira, são importantes no estudo da patogenicidade. É provável que o ambiente dentro da planta possua estímulos característicos, detectados pela bactéria através destas proteínas sensoras, desencadeando uma série de processos de interação com a planta.

Em *X. fastidiosa* são encontrados diferentes sistemas sensor-efetor. Um deles é o responsável pela formação de pili ou fímbrias do tipo IV (*pilS/pilR*), conforme já foi relatado. Outro sistema bastante interessante é o relacionado à ausência de fosfato inorgânico (P_i) no ambiente extracelular. Certamente, durante a interação com a planta hospedeira, a bactéria deve se adaptar às condições do xilema, que é nutricionalmente pobre, induzindo ou reprimindo alguns genes específicos. Os genes *phoR/phoB* compõe um sistema sensor-efetor ativado durante ausência de fosfato inorgânico em microrganismos como *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (Scholten & Tommassen, 1993; Shi & Hulett, 1999). *phoR* é um dos responsáveis pela ativação do regulon Pho, composto por cerca de 30 genes, todos relacionados ao suprimento de P_i na célula. Em *X. fastidiosa*, além de *phoR*, também são encontrados outros genes homólogos ao regulon Pho, *phoA*, *phoB*, *phoP* e também *phoQ* e *phoU*. Isto sugere que este mecanismo sensor-efetor seja ativo, embora o mecanismo de ativação ainda seja pouco esclarecido. Aparentemente existem dois sistemas sensores de níveis de fosfato em *X. fastidiosa*, já que, além de *phoR/phoB* também existem *phoQ/phoP*. Assim como em *E. coli* e *B. subtilis*, em *X. fastidiosa* os genes sensores-

efetores dos níveis de fosfato são adjacentes. Em *E. coli*, PhoR é uma histidina-quinase responsável pela fosforilação de PhoB. Esta proteína, uma vez fosforilada, pode regular a transcrição dos outros genes do regulon *pho*, reconhecendo seqüências específicas dos seus promotores (“*pho box*”). Entre os genes ativados está *phoA*, um gene que codifica a fosfatase alcalina, e é de extrema importância na ausência de fosfato. Além da fosfatase alcalina, também são ativados genes para diminuir a utilização de fosfato, como o operon *tua*, para síntese de polímero da parede, além de sistema de transporte de fosfato inorgânico (Shi & Hullet, 1999).

A regulação da atividade das proteínas celulares, por meio de modulação na transcrição, tradução ou pós-tradução, é essencial para que a célula responda adequadamente a estímulos externos. A proteólise, dessa maneira, é um evento importante na medida em que inativa determinadas proteínas e interrompe sua atividade na célula, podendo funcionar como um “marcador” do estado de estresse na célula. A degradação ocorre quando a proteína deveria ter sido exportada e não foi, ou se não apresentar sua conformação nativa, alterando sua superfície externa, por exemplo, devido a aumento na temperatura (Gottesman & Maurizi, 1992). De forma geral, estresses como pH elevado, etanol, ausência de nutrientes e temperaturas elevadas, provocam ativação de determinadas vias de resposta, como Cpx ou σ^E , responsáveis pela transcrição de proteínas que degradem ou corrijam a conformação de proteínas que se acumulam no periplasma com conformação anormal (Raivio & Silhavy, 2001). Algumas das proteínas envolvidas com a resposta de choque térmico (heat shock proteins, hsp) são proteases responsáveis pela eliminação de proteínas anormais, produzidas sob diferentes condições de estresse. Entre estes genes está *htpX*, que foi inicialmente descrito em *E. coli* como parte da resposta a altas temperaturas. De acordo com Kornitzer *et al* (1991), os genes hsp, entre eles *htpX*, são induzidos por

aumento de temperatura e são responsáveis pela degradação de proteínas com conformação estranha ao organismo. A síntese de RNA mensageiro destes genes é máxima após apenas 5 minutos de aumento de temperatura, decrescendo gradualmente em seguida (Neidhardt *et al.*, 1983). Em *Streptococcus gordonii*, a transcrição aumentada de *htpX* sob aumento de temperatura foi responsável por maior adesão celular (Vickerman *et al.*, 2002). Shimohata *et al.* (2002) relatam ainda que a regulação de *htpX* em *E. coli*, além de estar associada com o aumento de temperatura, também tem relação com a presença de proteínas de conformação anormal no periplasma, o que ativa o mecanismo de resposta Cpx. Embora o papel das proteínas de choque térmico seja pouco esclarecido na patogenicidade, resultados obtidos em nosso laboratório com *Xanthomonas* indicaram que estas proteínas podem ser induzidas na presença de extratos de plantas. Além disso, alguns autores sugerem que estas proteínas de resposta teriam importância na virulência de organismos como *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, por auxiliarem na manutenção de proteínas com conformação correta (Raivio *et al.*, 1999).

Além destes genes, outros foram catalogados como relacionados à virulência e adaptação (Simpson *et al.*, 2000). São genes que codificam para diferentes categorias funcionais, entre elas a produção de enzimas extracelulares, sistemas de secreção e fatores de regulação, os quais podem estar envolvidos com patogenicidade de forma indireta. O sistema de secreção do tipo II é bastante difundido entre bactérias Gram-negativas para secreção de fatores extracelulares que eventualmente podem contribuir para virulência (Salmond, 1994; Dow & Daniels, 2000; Lee *et al.*, 2001). As proteínas que compõem o sistema são encontradas em diversas bactérias, entre as quais destacam-se os gêneros *Xanthomonas* (*xps*); *Erwinia* (*out*) e *Klebsiella* (*pul*). Mutantes para algumas proteínas da via de secreção apresentam virulência atenuada, o que sugere que a maior parte das

proteínas secretadas é fator de virulência. No caso de fitopatógenos, a secreção de enzimas extracelulares como pectato liase, poligalacturonases e celulases, é importante na degradação da parede celular vegetal e no estabelecimento da infecção (Salmond, 1994; Dow & Daniels, 2000). As proteínas secretadas pelo sistema tipo II são sintetizadas com uma seqüência N-terminal típica, processada somente após serem exportadas, no periplasma. O segundo passo é a secreção extracelular propriamente dita, da qual participam cerca de 14 proteínas (Salmond, 1994; Russel, 1998). Em *X. fastidiosa* são encontradas 10 proteínas relacionadas à secreção do tipo II, organizadas em um operon denominado *xps* (XF 1517 - XF 1527) de cerca de 11 kb, além de uma 11^a, distante das demais (XF 2537). Além destas proteínas também estão presentes as proteínas Sec, responsáveis pela primeira etapa de secreção. Os dados do genoma também revelam que existe uma categoria de ORFs relacionada a degradação de parede celular, o que sugere um mecanismo de secreção do tipo II ativo, responsável pela secreção de enzimas extracelulares ao hospedeiro. A poligalacturonase encontrada na linhagem de *X. fastidiosa* isolada de citros, entretanto, possui uma mutação “frameshift”, o que pode indicar que é uma enzima não funcional. Isto explicaria, de acordo com Van Sluys *et al.* (2002), o longo período de incubação desta linhagem. Na linhagem isolada de videira, entretanto, esta enzima não possui tal mutação, e, de fato, o período de incubação é menor e a linhagem parece ser mais “agressiva”. Estas análises, no entanto, são puramente baseadas nas seqüências e ainda requerem comprovação por experimentos (Van Sluys *et al.*, 2002, 2003).

3.3. Estudo comparativo de genomas de *X. fastidiosa* de diferentes hospedeiros

Depois da publicação do genoma da linhagem 9a5c, em 2000 (Simpson *et al.*), uma outra linhagem, isolada de videira, foi seqüenciada e também outras duas linhagens, isoladas de amêndoa e espiiradeira tiveram seus genomas parcialmente seqüenciados (de Oliveira *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2002a, 2002b). A comparação entre as seqüências disponíveis forneceu boas indicações sobre as diferenças entre os isolados bem como as especificidades com relação aos respectivos hospedeiros. O uso de *microarrays* permitiu observar que aproximadamente 90% das ORFs encontradas em *X. fastidiosa* isolada de citros (9a5c; patovar citros) são também encontradas no isolado de videira (linhagem Temecula 1). Além disso, cerca de 65% das ORFs exclusivas de citros são proteínas hipotéticas ou hipotéticas conservadas. Também foram observadas diferenças com relação ao metabolismo intermediário, inclusive de reguladores transcricionais, indicando que existe diferença no controle da expressão gênica entre as duas linhagens. Isto pode estar relacionado à diferença de hospedeiro entre as duas linhagens e ao mecanismo de desenvolvimento da doença. Transportadores membranares, fatores considerados importantes na patogenicidade do isolado de citros, não foram encontrados no isolado de videira, assim como duas desidrogenases e duas redutases (de Oliveira *et al.*, 2002).

Com relação aos isolados de amêndoa e espiiradeira, aproximadamente 82% das proteínas são conservadas (cerca de 7.002 ORFs no total), e destas, cerca de 2% são características do gênero *Xylella*. Algumas diferenças entre as seqüências dos genes putativos para adesinas sugerem que há uma especificidade da adesina com o hospedeiro, uma vez que os 3 genomas diferem neste aspecto (Bhattacharyya *et al.*, 2002a). Cerca de 133 ORFs presentes no genoma do isolado de amêndoa (5%) não foram encontrados nos

outros dois genomas analisados. Estas ORFs estão relacionadas ao sistema de conjugação Tra e a duas endonucleases de restrição, similares a *SphI* e *NgoM1*. No genoma de espirradeira, aproximadamente 7% das ORFs são exclusivas, não tendo sido encontradas nos outros dois genomas. São ORFs relacionadas a fagos, e podem ser resultado de transferência horizontal. Este genoma, inclusive, revelou um epissomo de 30 kb, que contem proteínas relacionadas ao sistema de secreção do tipo IV (Vir), similar àquele encontrado em *Agrobacterium tumefaciens* (Bhattacharyya *et al.*, 2002a; 2002b).

O isolado de citros, 9a5c, foi a linhagem que apresentou as maiores diferenças com relação às demais. 13% das ORFs (389) não são encontradas nos outros genomas. Estas ORFs codificam diferentes moléculas, entre elas proteínas ribossomais, tirosil tRNA sintetase, fatores de transcrição e transportadores. Estas diferenças funcionais podem sugerir mecanismos de controle biológico específicos (Bhattacharyya *et al.*, 2002a). Ao contrário da anotação do genoma (Simpson *et al.*, 2000), uma nova análise mostrou que o sistema respiratório de *X. fastidiosa* (citros) é incomum e pouco eficiente. Embora a bactéria seja aeróbia, não é capaz de respirar em ambiente com baixa concentração de O₂, já que não possui carreadores de alta afinidade. Os autores sugerem, ainda, que este é um ponto importante para o desenvolvimento de drogas contra este fitopatógeno (Bhattacharyya *et al.*, 2002b).

Uma comparação entre genomas de bactérias associadas a plantas revelou que *X. fastidiosa* possui o menor genoma (de 2,7 Mb em comparação com cerca de 5 Mb de outros fitopatógenos), a menor quantidade de G+C e a menor proporção de regiões codificadoras. *X. fastidiosa* não possui certas vias metabólicas, o que impede sua rápida adaptação a diferentes ambientes. De fato, quando cultivada em meios mais ricos, *X. fastidiosa* é incapaz de crescer mais rapidamente, justamente devido a ausência destas vias alternativas.

Estes fatores levaram alguns autores a afirmar que *X. fastidiosa* seria um patógeno “mínimo” (Dow & Daniels, 2000; Van Sluys *et al.*, 2002). Isto pode ser resultado da forte pressão seletiva para a manutenção do genoma com o menor tamanho possível, acoplado a uma necessidade de adaptação a diferentes ambientes. Sob este ponto de vista, o genoma de *X. fastidiosa* é pequeno porque esta bactéria vive em um ambiente restrito (Van Sluys *et al.*, 2002).

3.4. Clonagem e Expressão Heteróloga em *Escherichia coli*

O estudo funcional dos genes identificados em *X. fastidiosa* é de grande importância principalmente para uma melhor compreensão de processos celulares, metabólicos, mecanismos de adaptação e interação em diferentes condições. Uma das abordagens utilizadas é a do estudo estrutural de proteínas cujas funções são pouco esclarecidas. Para isto, a proteína é produzida em sistema heterólogo, e, após sua purificação, utilizada para estudos estruturais. A estrutura tridimensional pode ser importante na determinação da(s) função(ões) biológica(s) da proteína, seja por meio de ensaios biológicos ou comparação com estruturas já resolvidas, depositadas no PDB – Protein Data Bank.

A primeira etapa para o estudo de proteínas é a sua expressão em sistemas que produzam altas quantidades sob baixo custo. São conhecidos exemplos de super-expressão em células de bactérias, leveduras, plantas e mamíferos. O sistema mais utilizado, certamente, é aquele baseado na expressão em células de bactéria, mais especificamente *E. coli*. Isto se deve ao extenso conhecimento sobre a fisiologia e genética desta bactéria, de forma que este é um dos melhores sistemas para estudos de expressão gênica. Embora os processos de secreção e modificações pós-traducionais não sejam eficientes, levando a

conformações diferentes daquelas da proteína nativa, as vantagens deste sistema são ainda bastante relevantes. A alta taxa de crescimento da bactéria aliada à grande massa produzida e ao baixo custo do seu cultivo incentivam sua utilização como sistema de expressão gênica heteróloga (Goeddel, 1990; Makrides, 1996).

A expressão de um gene em um sistema heterólogo, entretanto, depende de uma série de características, como a composição de bases do gene a ser expresso ou a estabilidade e tradução do RNA mensageiro (mRNA) no sistema. A expressão de produtos tóxicos para o microrganismo também é um fator relevante, uma vez que pode ser limitante para sua própria produção. Além disso, a produção elevada de proteínas heterólogas leva a bactéria a um estado de estresse, podendo até desencadear a transcrição de genes próprios relacionados à resposta de choque térmico, aumentando a atividade proteolítica da bactéria (Schweder *et al.*, 2002). Isto pode ser problemático uma vez que um alvo potencial para as proteases é a proteína de interesse. É também bastante comum ocorrer agregação da proteína expressa em corpos de inclusão no citoplasma. Isto se deve a dois fatores principais, são eles (1) a alta taxa de expressão e (2) a produção de proteínas insolúveis, provavelmente devido a falta de modificações ou conformação incorreta da proteína (Sachdev & Chirgwin, 1998). A solubilidade também é um fator crítico na expressão heteróloga e fatores como temperatura de crescimento da bactéria, concentração de indutor e tempo de indução tem sido importantes para melhorar a solubilidade da proteína de interesse. A tiorredoxina é utilizada como proteína de fusão para aumentar a solubilidade da proteína expressa. Também podem ser utilizadas proteínas chaperoninas, como as GroS e GroEL, que melhoram a expressão de proteínas insolúveis (Yasukawa *et al.*, 1995; Sachdev & Chirgwin, 1998).

Os estudos dos processos de transcrição e tradução em *E. coli* revelaram características importantes que podem influenciar na expressão gênica. Na tradução é preciso considerar o “codon usage” da bactéria, o que é entendido como uma preferência por determinados codons, possivelmente relacionada à abundância de tRNAs cognatos. Em 91% dos casos analisados o codon de iniciação é AUG e, na terminação a preferência é por UAA. Além disso, a localização da sequência Shine-Dalgarno, a cerca de 9 pb do codon de início, é importante na eficiência da tradução. A formação de estruturas secundárias no mRNA também pode impedir a correta iniciação da tradução (Goeddel, 1990; Makrides, 1996).

O uso de sistemas heterólogos envolve a utilização de plasmídios específicos para expressão, designados com promotores fortes e reguláveis, para garantir a alta taxa de síntese protéica. Eventualmente, são adicionadas pequenas sequências sinalizadoras na região amino- e/ou carboxi- terminal que funcionam como estabilizadores e direcionam a proteína para determinado local, além de poder facilitar sua purificação em etapas posteriores (Goeddel, 1990; Makrides, 1996). O vetor selecionado no presente trabalho é da série pET (Novagen). pET-32 Xa/LIC tem origem de replicação derivada do pBR322, possui promotor *T7lac* e terminador T7, além do gene *lacI* (para o repressor) e do gene *bla* (resistência a ampicilina). Este vetor também codifica resíduos de 6 histidinas na região carboxi- e amino-terminal, que poderão ser úteis na detecção e purificação da proteína recombinante. O vetor ainda possui um gene que codifica tiorredoxina (*trxA*), uma proteína de fusão que aumenta a solubilidade das proteínas expressas. O sítio para clivagem pelo fator Xa se encontra na extremidade 5' da região de clonagem, sendo importante para retirada das proteínas de fusão. O promotor *T7lac* é dependente da RNA polimerase do fago T7, que é produzida pela célula hospedeira (lisógeno λ DE3) sob controle do promotor

lacUV5, induzido por IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopiranosídeo). Da mesma maneira, o IPTG induz o gene clonado sob controle do promotor *T7lac*, expressando, assim, a proteína de interesse.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens de bactérias utilizadas e meios de cultura

X. fastidiosa 9a5c (Chang *et al.*, 1993) foi cultivada a 28°C sob agitação de 250 rpm em meio rico PW (Davis *et al.*, 1981) que contém, por litro, 4,0 g de phytona peptona, 1,0 g de trypticase peptona, 1,2 g K₂HPO₄, 1,0 g de KH₂PO₄; 0,4 g MgSO₄; 10 mL cloreto de hemin 0,1%; 10 mL de Phenol Red 0,2% e 10% de glutamina. Como meio mínimo foi utilizado o XDM com algumas modificações (Xylella Defined Medium, Lemos *et al.*, 2003), que contém, por litro, 0,23 g de KH₂PO₄; 0,10 g de MgSO₄. 7 H₂O; 1,1 g de ácido glutâmico; 4 mL de glicerol e 0,5 g de pirofosfato férrico. As clonagens foram realizadas com as linhagens de *E. coli* DH5α, BL 21(λDE3) e BL 21 (λDE3) pLysS. *E. coli* foi cultivada em meio LB ou em M9 + tiamina (5 mg/mL) (Sambrook *et al.*, 1989) sob agitação de 250 rpm à 37°C.

4.2. Preparação do extrato de plantas

Foram preparados extratos de nervuras das plantas hospedeiras laranja doce (*Citrus sinensis*), café (*Coffea arabica*) e tangerina “Ponkan” (*Citrus reticulata*), uma planta resistente (Laranjeira *et al.*, 1998). As folhas foram descontaminadas em solução de hipoclorito 5% por 10 min. e em seguida lavadas em água destilada esterilizada. Cerca de 1 g de nervura destas folhas foi triturado em 10 mL de meio de cultura e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 11000 rpm por 10 min.

Novamente foi recuperado o sobrenadante e este foi filtrado em membranas Millipore de 0,22 μm . O extrato foi mantido em gelo durante sua preparação e conservado a -70°C até sua utilização. Foi utilizada a concentração final de 1% (peso/volume) no meio mínimo de cultura (M9 ou XDM). Como controle, foi empregado o meio de cultura sem adição do extrato de planta.

4.3. Desenho de *primers*

Para cada ORF selecionada, foram desenhados e construídos dois tipos de *primers*. Um deles incluindo a possível região promotora do gene, aproximadamente a -100 pb do início da região codificadora (série de *primers* TR, de transcrição), e outro iniciando exatamente no códon de início da ORF, o ATG (*primers* da série PR, de proteína). As seqüências destes *primers* estão listadas na Tabela I, Anexo I. Os *primers* da série TR permitiram a análise dos transcritos em *E. coli*, nas diferentes condições experimentais utilizadas. A série de *primers* PR foi utilizada em reações de RT-PCR e para a clonagem dos genes correspondentes no vetor de expressão de *E. coli*.

Foram também desenhados outros 5 pares de *primers* para ORFs relacionadas com o regulon *pho* (Tab I, Anexo I), com o objetivo de verificar a regulação destes genes. Estes *primers* foram utilizados nas reações de RT-PCR.

4.4. PCR (Polymerase Chain Reaction) e clonagem

As reações de PCR foram padronizadas separadamente para cada par de *primers* e a extração de DNA total foi realizada de acordo com Rosato *et al.* (1998). À exceção das temperaturas de anelamento, os ciclos foram similares para os diferentes *primers*. Na reação foram utilizados 50 ng de DNA; 0,5 U de *Taq* DNA polymerase (Pharmacia, EUA); tampão 1X; 100 μ M dNTPs; 10 pmoles de cada *primer* em volume final de 25 μ L. Foi utilizada a ciclagem de 3 minutos a 94°C, seguindo-se 30-40 ciclos de 1 min à 94°C, 30 seg na temperatura de anelamento, 1 min e 30 seg à 72°C e 5 min à 72°C para extensão. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificado com kit Concert® para extração de gel (Gibco BRL, EUA). Os produtos de amplificação com os *primers* da série TR foram utilizados para clonagem em vetor pGEM T-easy (Promega, EUA) e aqueles com *primers* PR foram clonados em vetor pET 32 Xa/LIC, de acordo com as instruções do fabricante (Novagen, EUA). Como hospedeira foi utilizada a linhagem *E. coli* DH5 α . A clonagem do fragmento correto foi confirmada por reação de sequenciamento com kit Big Dye terminator (Applied Biosystems, EUA) em seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems, EUA) e posterior consulta das seqüências resultantes no Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.5. Cultivo de *X. fastidiosa* e *E. coli* em diferentes condições

4.5.1. *X. fastidiosa*

X. fastidiosa foi submetida a diferentes condições de cultivo para o estudo da transcrição das ORFs selecionadas. Inicialmente, a bactéria foi cultivada durante 12 dias em meio PW, sendo que a cada 4 dias o meio era trocado. Em seguida, foi transferida para meio mínimo XDM, de onde se iniciaram os experimentos. Nos tratamentos com extrato de plantas, *X. fastidiosa* foi cultivada por 4 dias em XDM, sendo em seguida transferida para 4 tratamentos: XDM (controle); XDM acrescido de extratos de laranja doce (Ci), “Ponkan” (Po) e café (Ca), separadamente. As células foram coletadas após 4 dias de cultivo e submetidas a extração de RNA.

Para o experimento de transcrição sob diferentes concentrações de fosfato, o meio mínimo XDM foi modificado de forma que as fontes de PO_4 deste meio (pirofosfato férrico e KH_2PO_4) fossem controladas nos experimentos. Assim, este meio será referido como XDM*. *X. fastidiosa* foi cultivada em meio XDM por 4 dias e, em seguida, transferida para o meio XDM* com cloreto de hemin (0,1%) com concentrações de KH_2PO_4 que variavam entre 0 e 0,2 g/L. Em um segundo experimento, *X. fastidiosa* foi transferida para o meio XDM* contendo pirofosfato férrico (0,5 g/L) e concentrações de KH_2PO_4 variando entre 0 e 0,4 g/L. Em ambos os casos, as culturas foram mantidas por 4 dias a 28°C sob agitação de 250 rpm. As células então foram coletadas e submetidas à extração de RNA.

Para o teste de choque térmico, a cultura de 12 dias em PW foi dividida entre os meios PW e XDM. Após 24 horas de incubação a 28°C, uma amostra de cada meio foi transferida para incubação a 37°C. Alíquotas foram retiradas após 8 e 24 horas de

incubação a 37°C e a 28°C (controle) de ambos os meios. Estas amostras também foram submetidas e extração de RNA.

4.5.2. *E. coli* recombinantes

O procedimento para indução com extrato utilizando *E. coli* contendo os plasmídios pGEM T-easy recombinantes foi realizado em meio mínimo M9, como descrito a seguir. A cultura inicial foi efetuada em 10 mL de meio M9 por 16 horas. As células foram então transferidas para 2 tratamentos: meio M9 (controle) e meio M9 com extrato de laranja doce (MCi). Durante 12 horas foram coletadas amostras destas culturas em intervalos de 3 horas. Estas amostras foram submetidas à extração de RNA. Além disso, estas células recombinantes também foram cultivadas por 6 horas a 37°C em meio M9 e em M9 acrescido de extratos de laranja doce (M9+Ci), “Ponkan” (M9+Po) e café (M9+Ca), separadamente, além do meio LB. Todas estas amostras foram em seguida submetidas à extração de RNA.

Os recombinantes referentes à ORF XF 2625, *htpX*, foram submetidos a teste de choque térmico para verificar se havia alteração na sua transcrição. A cultura inicial foi efetuada em 20 mL de meio LB por 16 horas a 37°C sob agitação de 250 rpm. Estas células foram então inoculadas em meio LB e, quando a A_{600} atingiu 0,6 foi realizado o choque térmico, transferindo a cultura para 45°C. Amostras de células foram retiradas após 5, 10, 20 e 40 minutos de choque térmico e foram submetidas à extração de RNA. Como controle, parte da cultura foi mantida a 37°C.

4.6. Extração de RNA

O RNA total foi extraído de forma semelhante para todos os tratamentos envolvendo *X. fastidiosa* e *E. coli*. Foi empregado o protocolo que utiliza fenol ácido (pH ~4,3), descrito em www.microarrays.org/pdfs/Total_RNA_from_E.coli.pdf. A qualidade e quantificação da preparação foi verificada em gel de agarose 1% desnaturante contendo formamida deionizada. O RNA extraído foi tratado com DNase para eliminar resíduos de DNA que pudessem comprometer as reações seguintes. Como controle negativo, foram realizadas reações de PCR com *primers* randômicos utilizando estes RNAs tratados como molde para verificar se ainda restava DNA nas amostras.

4.7. RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)

Para síntese da fita complementar, à cada 100 ng de RNA foram adicionados *primers* específicos (série PR) na concentração final de 1 μ M e a reação foi incubada por 15 min. à 68°C. A seguir, foram acrescentados o tampão da enzima; 0,1 M DTT; 10 mM dNTPs e 5 U de transcriptase reversa (Invitrogen, EUA). A mistura foi incubada por 1 hora à 37°C e estocada a -20°C. Para as amostras de tratamentos em *X. fastidiosa*, o cDNA foi sintetizado com o kit cDNA Cycle Kit (Invitrogen, EUA), que utiliza *primers* randômicos, de acordo com protocolo do fabricante.

Os *primers* da série PR foram utilizados para amplificação de cDNAs sintetizados de acordo com protocolo acima descrito. A reação de RT-PCR foi montada utilizando-se ~50 ng do cDNA sintetizado, tampão da enzima 1X, 120 μ M de dNTPs, 10 pmoles de cada

primer específico em volume final de 25 µL. Inicialmente a reação ficou por 5 min. a 95°C, seguindo-se 25 ciclos de 30 seg. a 95°C, 30 seg. na temperatura de anelamento e 2 min. a 72°C. Um outro ciclo, mais longo, foi empregado para amplificação dos cDNAs sintetizados com o kit (Invitrogen, EUA). Após a desnaturação inicial, de 3 min. a 94°C, seguiram-se 30 ciclos de 1 min. a 94°C, 2 min. na temperatura de anelamento e 3 min. a 72°C. Os produtos de RT-PCR foram separados em gel de agarose 0,8%. Para padronização das concentrações, os cDNAs eram inicialmente amplificados com *primers* universais para bactérias do subgrupo γ para o gene ribossomal 16S, que funcionou como um controle positivo para as reações.

4.8. Clonagem em vetor de expressão

Os *primers* PR foram utilizados para amplificar os fragmentos correspondentes às ORFs selecionadas utilizando-se DNA total de *X. fastidiosa*. Estes fragmentos foram separados em gel de agarose 0,8% e purificados com kit Concert® para extração de gel (Gibco BRL, EUA). Em seguida foi realizado um tratamento com T4 DNA polimerase para que os fragmentos pudessem se ligar ao vetor pET 32 Xa/LIC. A clonagem foi realizada em *E. coli* DH5 α e foi confirmada por reação de sequenciamento com kit Big Dye terminator (Applied Biosystems, EUA) em sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems, EUA) utilizando os plasmídios recombinantes. O DNA destes plasmídios, obtido a partir de mini preparação de plasmídeo com kit Concert® (Gibco-BRL, EUA), foi utilizado para transformação em diferentes células hospedeiras de *E. coli* λ DE3 para expressão.

4.8.1. Expressão heteróloga

Nos experimentos de expressão heteróloga foram utilizadas as linhagens de *E. coli* BL21 (λ DE3) e BL21 (λ DE3) pLysS cultivadas em meio LB com ampicilina (40 mg/mL). A partir de uma colônia isolada foi realizado cultivo a 37°C por 16 horas. Este material foi em seguida inoculado em meio LB com A_{600} inicial de 0,1. A cultura foi mantida a 37°C até que a A_{600} atingiu 0,6. Neste ponto, foi adicionado o indutor IPTG (em concentração variável, de acordo com a padronização) e alíquotas de células foram retiradas no tempo 0 e após 2,4, 6 e 8 horas de indução. O perfil de proteínas foi examinado por SDS-PAGE.

4.9. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

As células foram submetidas à extração de proteínas totais para SDS-PAGE de acordo com Jackman (1985). Além disso, também foram utilizadas para separação das frações solúvel e insolúvel de acordo com protocolo descrito a seguir. A massa celular foi inicialmente ressuspensa em 200 μ L de tampão L (Tris HCl [pH 8,0] 50 mM, EDTA 10 mM, sacarose 25%), a seguir foram adicionados 400 μ L do tampão 2 (Tris HCl [pH 8,0] 0,25 M e EDTA 0,25 M) e 1 mg/mL de lisozima. A mistura foi incubada por, no mínimo, 30 min. no gelo. Em seguida foram adicionados 600 μ L de tampão L com 2% de Triton X-100. A mistura foi então submetida a três ciclos de 15 seg. de sonicação com potência 14 (70%) em sonicador *microson ultrasonic cell disruptor XL* (Misonix, EUA), com 1 min. de intervalo entre os ciclos. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 min. a 12000 rpm,

4°C e o sobrenadante, recuperado como “fração solúvel”, foi armazenado a -20°C. Ao *pellet* foram adicionados 1 mL de tampão L com 2% de Triton X-100 e, novamente, esta mistura foi submetida a dois ciclos de 15 seg. de sonicação, com intervalo de 1 min. entre os ciclos. A amostra foi novamente centrifugada por 10 min., 12000 rpm, 4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de tampão L e armazenado a -20°C como “fração insolúvel”. As amostras das frações solúvel e insolúvel foram desnaturadas com tampão de amostra e β-mercaptoetanol por 5 min. a 95°C e submetidas a SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida, 4% e 10% de acrilamida para os géis de empacotamento e resolução, respectivamente. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

4.10. Western blot

Os experimentos de Western blot foram realizados para verificar a expressão correta das proteínas de fusão. Foram preparados géis de poliacrilamida conforme descrito na seção anterior contendo as proteínas totais de cada um dos clones induzidos com 1 mM IPTG por 4 horas a 37°C. A exceção foi apenas o clone da ORF XF 2625 (*htpX*) que necessita de 2 mM IPTG para indução. A transferência para membrana de nitrocelulose (5,5 cm por 8,5 cm) (Hybond N – Amersham Pharmacia®, EUA) foi realizada por 1 hora a 40 mA (por gel) em aparelho MultiphoR Novablot. Em seguida esta membrana foi transferida para solução de bloqueio (Tris 2,5 mM contendo NaCl 137 mM, KCl 0,7 mM, Tween 20 0,05% e leite em pó 5%), na qual foi incubada a 4°C durante a noite. A membrana então foi incubada por duas horas com anticorpo primário anti-His tag (Santa

Cruz Biotechnology, EUA) diluído na proporção 1: 2.000 em solução Tris 2,5 mM contendo NaCl 137 mM, KCl 0,7 mM, Tween 20 0,05% e leite em pó 5%. Em seguida foram realizadas duas lavagens de 10 min. com tampão contendo Tris 2,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 0,7 mM, Tween 20 0,05%. A membrana foi novamente incubada por duas horas, agora com anticorpo secundário, anti-IgG (1:5.000) conjugado com fosfatase alcalina. Após a incubação esta membrana foi lavada com o tampão de lavagem (Tris 2,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 0,7 mM, Tween 20 0,05%) por 2 vezes de 10 min. Em seguida foi transferida para tampão de equilíbrio por 5 min. (Tris 100 mM pH 9,5 e NaCl 100 mM). Por fim, a membrana foi incubada em tampão de equilíbrio com substrato quimioluminescente CSPD (1:2.000). A autoradiografia foi realizada por 5 e 20 min.

5. RESULTADOS

5.1. Análise da transcrição em *X. fastidiosa*

X. fastidiosa foi cultivada em diferentes condições com o objetivo de estudar a transcrição dos genes selecionados utilizando-se reações de RT-PCR. Três genes selecionados (*xpsL*, *xpsE* e *pilS*) foram descritos como possivelmente envolvidos na patogenicidade e, dessa forma, um dos experimentos consistiu em verificar o efeito da adição de extratos de laranja doce (Ci), “Ponkan”(Po) e café (Ca), ao meio mínimo de cultura XDM. Os genes *htpX*, envolvido com choque térmico, e *phoR*, que participa da resposta a níveis alterados de fosfato (PO₄), também foram incluídos na análise desde que alterações ambientais (estresse e níveis de PO₄ nos diferentes tratamentos) poderiam também influenciar na resposta destes genes.

O RNA total das células submetidas aos diferentes tratamentos foi extraído e a síntese de cDNA foi efetuada com *primers* randômicos. A concentração de RNA utilizada foi estimada visualmente em gel de agarose 1% contendo formamida deionizada através das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 16S e 23S. A concentração de cDNA a ser utilizada em cada reação de RT-PCR foi determinada por uma reação controle utilizando-se os *primers* para o gene ribossomal 16S. A partir destes resultados foi determinada a concentração de cDNA a ser empregada em cada reação de RT-PCR com os *primers* específicos PR (Tab I, Anexo I). Foram realizadas repetições, utilizando diferentes preparações de RNA e cDNA. Como controle negativo foram realizadas reações de PCR

utilizando *primers* randômicos e o RNA como molde. Nenhuma das amostras apresentou contaminação com DNA.

Os resultados do experimento com extrato de plantas (Fig.1 e Tab. 1) mostraram que nenhum dos genes, à exceção de *phoR*, foi detectado no meio XDM. Em meio com extrato de laranja doce, XDM+Ci, apenas *xpsL* não foi observado. Os demais transcritos foram detectados em todas as outras condições, indicando que meios de cultura ricos (PW) ou acrescidos de extratos de plantas são capazes de regular a transcrição destes genes. Algumas diferenças quantitativas podem ser observadas principalmente com relação aos genes *phoR*, *htpX* e *pilS*. Embora as concentrações de cDNA tenham sido padronizadas com o *primer* do gene 16S, as reações revelaram algumas diferenças quantitativas, que não foram reprodutíveis, assim, neste trabalho, a análise das reações de RT-PCR será qualitativa.

Tabela 1. Expressão dos transcritos de *X. fastidiosa* em diferentes condições.

ORF	gene	Tratamentos ¹				PW	Função hipotética
		XDM	XDM+Ci	XDM+Po	XDM+Ca		
XF 1524	<i>xpsL</i>	-	-	+	+	+	Secreção tipo II
XF 2592	<i>phoR</i>	+	+	+	+	+	Sensor efector de fosfato
XF 2625	<i>htpX</i>	-	+	+	+	+	Proteína de choque térmico
XF 1517	<i>xpsE</i>	-	+	+	+	+	Secreção tipo II
XF 2546	<i>pilS</i>	-	+	+	+	+	Biossíntese de pili

¹ XDM+Ci: meio mínimo XDM com extrato de laranja doce; XDM+Po: meio mínimo XDM com extrato de tangerina “Ponkan”; XDM+Ca: meio mínimo XDM com extrato de café.

Dois outros experimentos foram efetuados com a finalidade de testar condições de crescimento específicas de *X. fastidiosa* utilizando-se os genes *phoR* e *htpX*.

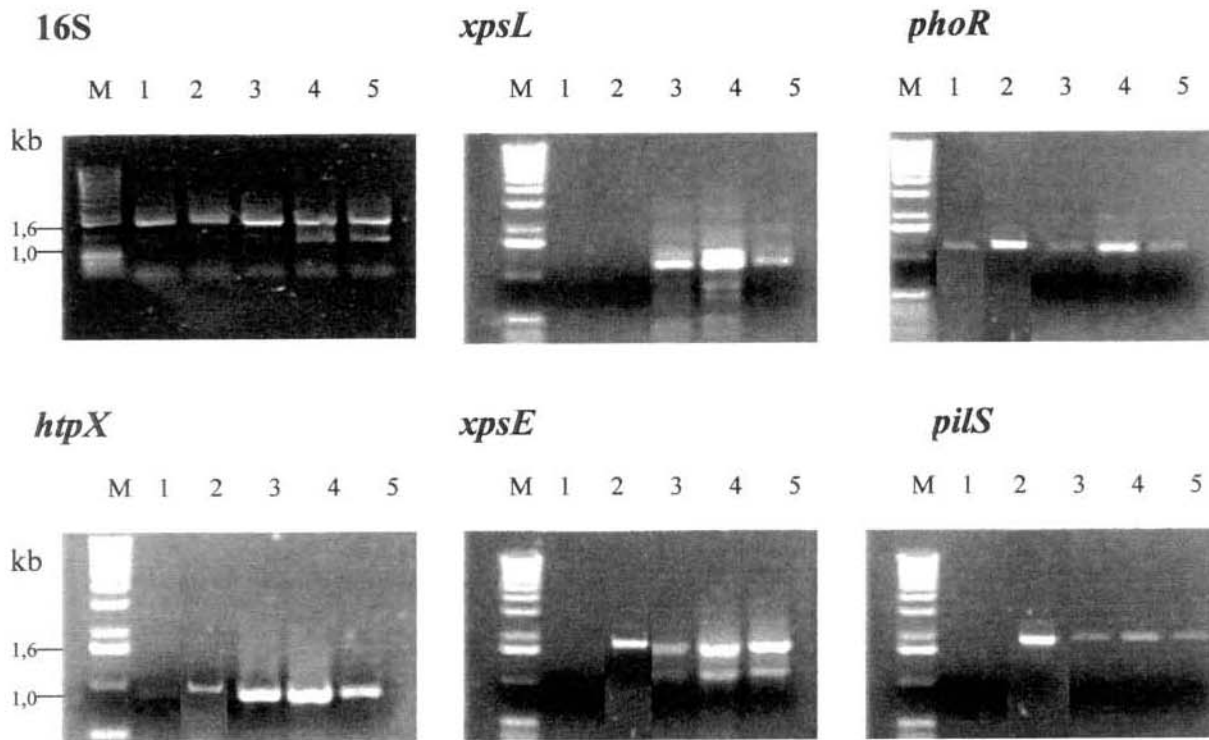


Figura 1. RT-PCR de *X. fastidiosa* cultivada em diferentes meios, utilizando *primers* para os genes indicados na figura. M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA); 1, meio mínimo XDM; 2, XDM+laranja doce; 3, XDM+Ponkan; 4, XDM+Café; 5, meio rico PW. O *primer* 16S foi utilizado como controle positivo.

5.1.1. Transcrição de *phoR* sob diferentes níveis de PO₄.

Foram testadas diferentes concentrações de fosfato no meio mínimo com o objetivo de verificar o efeito deste componente no metabolismo de PO₄ em *X. fastidiosa*. Em *E. coli*, PhoR é uma proteína sensora (histidina-quinase) de níveis alterados de fosfato no meio. Uma vez ativada, esta proteína fosforila PhoB, que, por sua vez, funciona como ativador transcricional de uma série de outros genes, entre eles o responsável pela produção de fosfatase alcalina (*phoA*) (Yamada *et al.*, 1989).

O meio mínimo XDM foi modificado de forma que todas as fontes de PO₄ fossem controladas nos experimentos. Neste meio são utilizadas duas fontes de PO₄: KH₂PO₄ e pirofosfato férrico. Como o ferro é um componente indispensável (Lemos *et al.*, 2003), o pirofosfato férrico foi substituído por cloreto de hemin numa primeira avaliação para verificar tanto o crescimento da bactéria como a transcrição do gene *phoR*. Foi observado que a utilização de cloreto de hemin (0,1%) com concentrações variáveis de KH₂PO₄ (0; 0,05; 0,1 e 0,2 g/L) não resultou em alterações significativas na transcrição de *phoR* (Fig. 2 e 3). Considerando que *phoR* seria totalmente reprimido em altas concentrações de PO₄, de acordo com dados da literatura para outras espécies (Yamada *et al.*, 1989), um outro experimento foi introduzido, mantendo-se a concentração de pirofosfato férrico a 0,5 g/L e variando-se a concentração de KH₂PO₄ (0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 g/L), ou seja, com uma alta concentração de PO₄. Os resultados de RT-PCR obtidos (Fig. 2 e 3) indicam que mesmo nestas condições não ocorreu repressão de *phoR*. Neste caso, *phoR* parece responder de maneira constitutiva aos diferentes níveis de PO₄ utilizados.

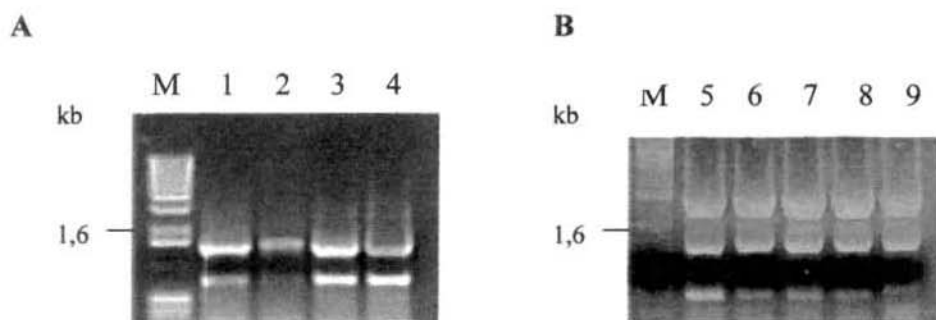


Figura 2. RT-PCR de *X. fastidiosa* submetida a tratamento em XDM* com diferentes concentrações de KH_2PO_4 utilizando *primer* para gene ribossomal 16S (controle positivo). Os números indicam os diferentes tratamentos. 1, XDM* sem KH_2PO_4 ; 2, XDM*+ 0,05 g/L KH_2PO_4 ; 3, XDM*+ 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 4, XDM*+ 0,2 g/L KH_2PO_4 ; 5, XDM* sem KH_2PO_4 ; 6, XDM*+ 0,05 g/L KH_2PO_4 ; 7, XDM*+ 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 8, XDM*+ 0,2 g/L KH_2PO_4 ; 9, XDM* + 0,4 g/L KH_2PO_4 . Em (A) XDM* com cloreto de hemin (0,1%) e em (B) XDM* com pirofosfato férrico (0,5 g/L). M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA).

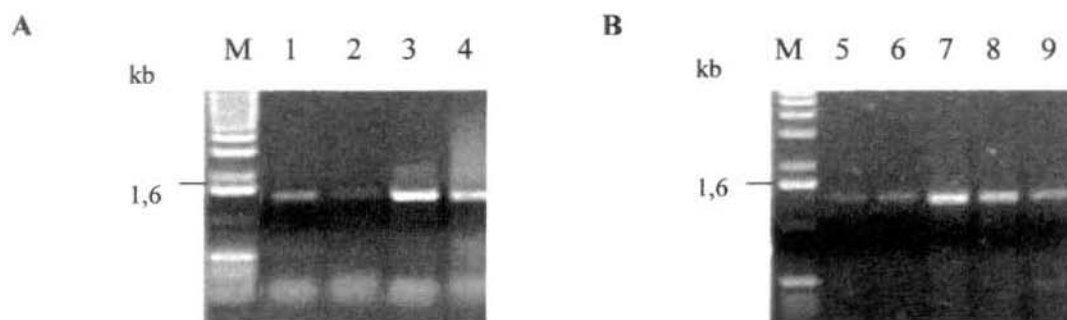


Figura 3. RT-PCR de *X. fastidiosa* submetida a tratamento em XDM* com diferentes concentrações de KH_2PO_4 , utilizando *primer* PR para ORF *phoR*. Os números indicam os diferentes tratamentos. 1, XDM* sem KH_2PO_4 ; 2, XDM*+ 0,05 g/L KH_2PO_4 ; 3, XDM*+ 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 4, XDM*+ 0,2 g/L KH_2PO_4 ; 5, XDM* sem KH_2PO_4 ; 6, XDM*+ 0,05 g/L KH_2PO_4 ; 7, XDM*+ 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 8, XDM*+ 0,2 g/L KH_2PO_4 ; 9, XDM* + 0,4 g/L KH_2PO_4 . Em (A) XDM* com cloreto de hemin (0,1%) e em (B) XDM* com pirofosfato férrico (0,5 g/L). M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA).

5.1.2. Transcrição de outros genes do regulon *pho* sob diferentes níveis de PO₄.

Para compreender melhor o metabolismo de fosfato nas células de *X. fastidiosa*, foram selecionados outros genes do regulon *pho*, *phoB*, *phoA* e *phoU* (Tab. 2). A transcrição destes genes também foi testada, por meio de RT-PCR, nas amostras obtidas conforme descrito anteriormente (item 5.1.1). De acordo com as Figuras 4 e 5, todos os genes são transcritos nas diferentes concentrações de KH₂PO₄ bem como na presença de cloreto de hemin e pirofosfato férrico. Este padrão é coerente com aquele relatado para *phoR*, o que era esperado, já que PhoR é a proteína sensora responsável pela ativação de *phoB*, *phoA* e *phoU*. Além destes genes, também foi analisada a transcrição de outro sistema de transdução de sinal relacionado a fosfato, também presente no genoma de *X. fastidiosa*, representado pelos genes *phoQ* (proteína sensora) e *phoP* (proteína efetora), responsável pela regulação da fosfatase ácida. Estes genes também foram transcritos em todas as condições testadas (Figuras 4 e 5).

Tabela 2. Genes relacionados ao regulon *pho*

ORF	Gene	Tamanho	
		(kb)	Função hipotética
XF 2145	<i>phoU</i>	0,71	Regulador transcricional
XF 0657	<i>phoA</i>	1,7	Fosfatase alcalina A
XF 0390	<i>phoQ</i>	1,4	Proteína sensora
XF 0389	<i>phoP</i>	0,68	Proteína efetora
XF 2593	<i>phoB</i>	0,8	Proteína efetora

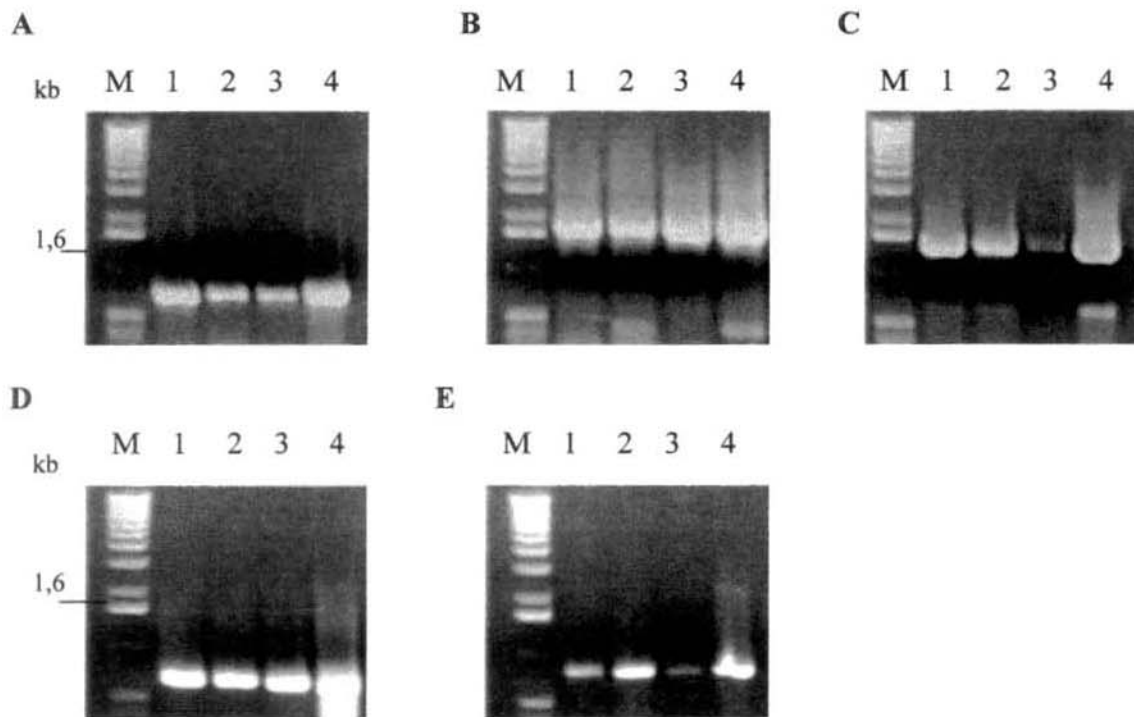


Figura 4. RT-PCR de *X. fastidiosa* submetida a tratamento em XDM* com cloreto de hemin (0,1%) e diferentes concentrações de KH_2PO_4 , utilizando *primers* para genes do regulon *pho*. Em (A) *primer phoU*; (B) *primer phoA*; (C) *primer phoQ*; (D) *primer phoP*; (E) *primer phoB*. Os números indicam os diferentes tratamentos. 1, XDM* sem KH_2PO_4 ; 2, XDM*+ 0,05 g/L KH_2PO_4 ; 3, XDM*+ 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 4, XDM*+ 0,2 g/L KH_2PO_4 . M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA).

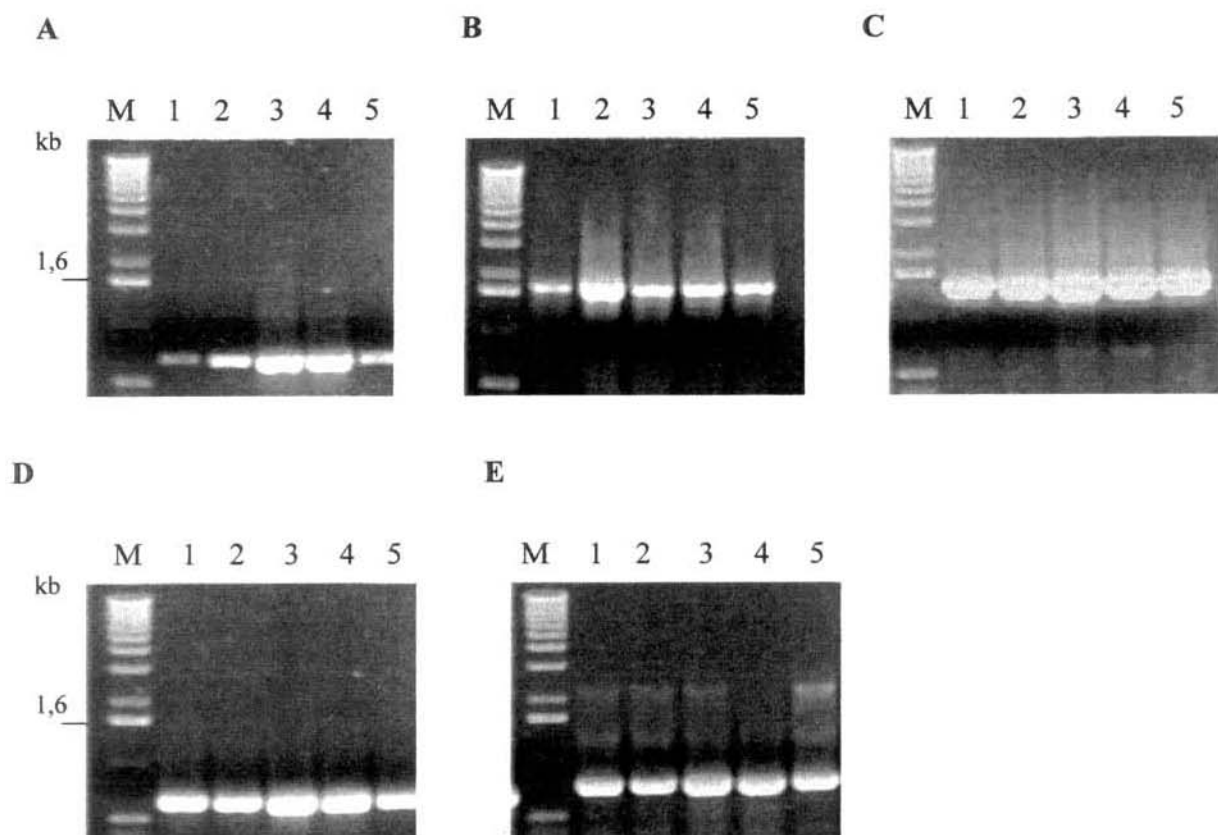


Figura 5. RT-PCR de *X. fastidiosa* submetida a tratamento em XDM* com pirofosfato férrico (0,5 g/L) e diferentes concentrações de KH_2PO_4 , utilizando *primers* para genes do regulon *pho*. Em (A) *primer phoU*; (B) *primer phoA*; (C) *primer phoQ*; (D) *primer phoP*; (E) *primer phoB*. Os números indicam os diferentes tratamentos. 1, XDM* sem KH_2PO_4 ; 2, XDM*+ 0,05 g/L KH_2PO_4 ; 3, XDM*+ 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 4, XDM*+ 0,2 g/L KH_2PO_4 ; 5, XDM*+ 0,4 g/L KH_2PO_4 . M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA).

5.1.3. Transcrição de *htpX* sob diferentes condições de meio e temperatura.

Com relação ao gene *htpX*, foi verificada a transcrição nos meios de cultura PW e XDM às temperaturas de 28°C e 37°C com amostras coletadas após 8 e 24 horas de crescimento. Conforme os resultados obtidos (Fig. 6), o transcrito não mostrou alteração em meio PW, onde foi detectado a 28°C e a 37°C. Entretanto, em meio XDM, ocorreu ativação da transcrição a 37°C, indicando uma regulação da sua transcrição por temperatura em meio mínimo, conforme já foi relatado na literatura em *E. coli* (Kornitzer *et al.*, 1991).

5.2. Amplificação das ORFs de *X. fastidiosa* com *primers* da série TR e clonagem em *E. coli*

Para cada ORF selecionada foi desenhado um par de *primers* designado “TR”. Esta série de *primers* inclui, além das ORFs correspondentes, as possíveis regiões regulatórias localizadas “upstream” ao início do genes. A inclusão destas regiões regulatórias permitiu estudar a transcrição dos genes em um sistema alternativo, *E. coli*, que é uma bactéria mais facilmente cultivada. Para o desenho dos *primers* TR (Tab. I; Anexo I) foram consideradas as composições de bases das regiões -10 e -35 de cada gene, procurando seqüências ricas em TA e GC, respectivamente (Fig. 7). Os produtos de amplificação obtidos apresentaram tamanhos de acordo com o esperado, com cerca de 200 pb em adição às regiões codificadoras (Fig. 8A). Os fragmentos foram purificados, ligados ao vetor de clonagem pGEM T-easy (Promega, EUA) e utilizados para transformar *E. coli* DH5 α . A obtenção de plasmídios recombinantes foi confirmada por reação de PCR, utilizando os *primers* TR.

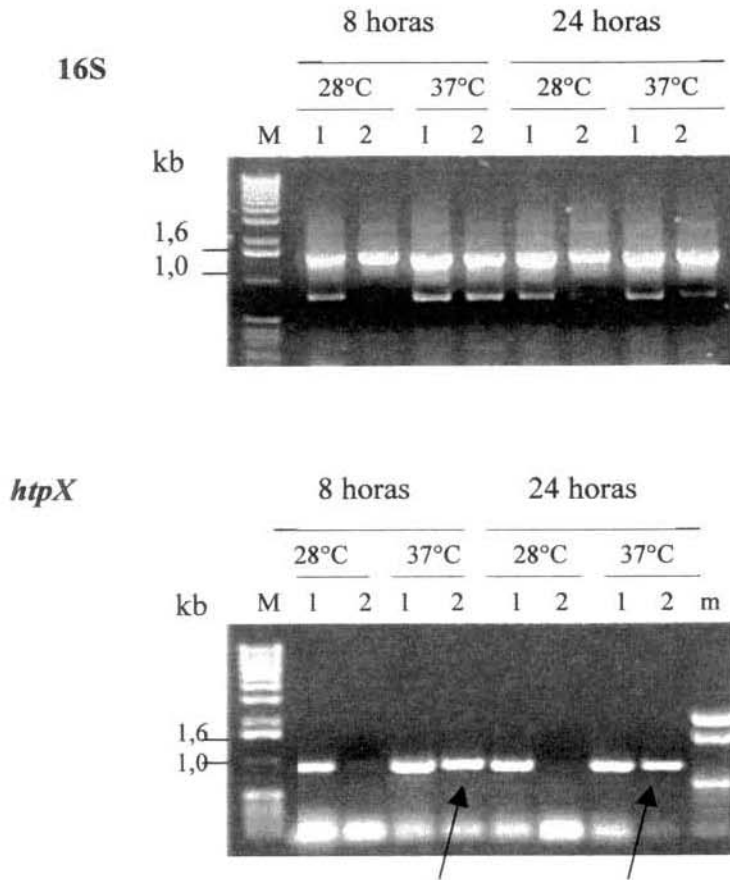


Figura 6. RT-PCR de *X. fastidiosa* submetida a choque térmico (37°C), utilizando-se o *primer* PR para ORF *htpX*, em meio rico PW (1) e mínimo XDM (2) por diferentes períodos de tempo. M, marcador molecular 1 kb (Invitrogen, EUA); m, marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA). As setas indicam ativação da transcrição sob maior temperatura em meio XDM.

XF 1524 - *xpsL*

AG CAA ACA GAT GGG CAG TGG CAC TTA CAG TAT TGA GAG CAA GGT ACG GCT
GGC TCA GGG GCG CGA AGC CGT GTT GCG CGC GGT CGT CCG CAT GGG AGG
GGG GCG TAT GCC AGG AGC GAC TTA CAC CAT TTT GAA TTG

XF 2592- *phoR*

TT GCG TAG AAC GTT GGA GCC ATA CGG CCT TGA CGA TAT GGT GCA GAC GGT
ACG TAG TGC CGG TTA TCG CTT CTC CGG GGC GAT CCA GAT CTG AAT ATT
CCA TCG AAT GCC GTG

XF 2625 - *htpX*

TT TAT CGC TTG ATA TTC ACT GAG ACT GGC CAC ACA TTC TGA TGT GTA TTC
TTT TCC GTA TTT TGG AAT ATT CGT TAT ATG

XF 1517 - *xpsE*

AT CTG TTT TCT ACC TTC AGG TGC GAT TCG GTT GGT GAT GAA AGT GTG TGG
CTT AAT AAG GGG AAT TTA TTG AAG AGA TGA GCG GTC GTT ATT TTA TGG
TGT CCG AAT GTG

XF 2546 - *pilS*

CCA AGG ATT TGG CGG CTG TGA CCG CTT CAT CAG CTG AAG ACG CGA TGC
GTC CGG CCG GAA CAG GGA TGC CGT ATT CGG CAA ATA GTT GTT TTG

Figura 7. Seqüências possivelmente envolvidas com a regulação dos promotores dos genes selecionados, analisadas para o desenho dos *primers* TR. Em azul, o códon de iniciação, em laranja, as prováveis seqüências -10 e, em verde, prováveis seqüências -35.

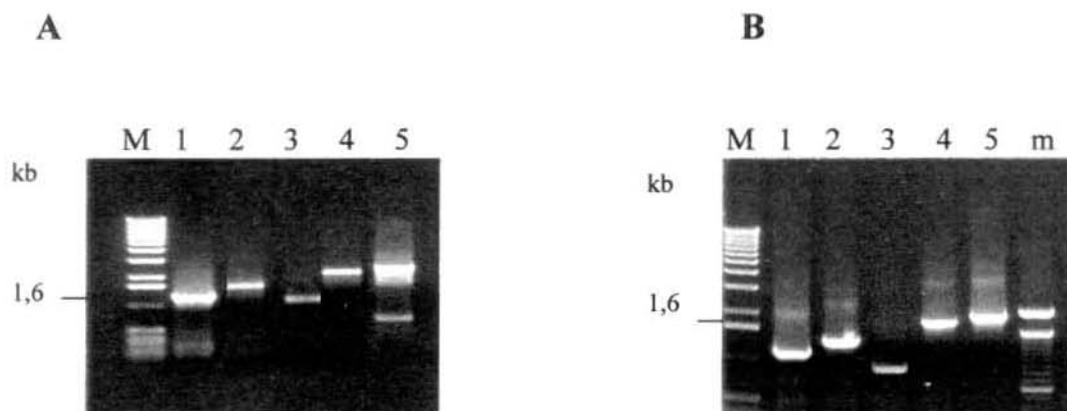


Figura 8. Produtos de amplificação do DNA cromossômico de *X. fastidiosa* utilizando os *primers* TR (A) e PR (B) para as ORFs selecionadas. 1, *xpsL*; 2, *phoR*; 3, *htpX*; 4, *xpsE*; 5, *pilS*. M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA); m, marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, EUA).

5.3. Transcrição em *E. coli*

Os plasmídios recombinantes obtidos foram utilizados para realizar a cinética de indução em meio mínimo M9 com adição de extrato de laranja doce (Ci). As células de *E. coli* recombinantes foram cultivadas em meio M9 e em M9 com extrato de laranja doce (MCi) e os RNAs totais de cada tratamento, nos tempos 3, 6, 9 e 12 horas, foram isolados para as reações de RT-PCR (Fig. 9). Como controle foi empregada *E. coli* DH5 α nos tempos correspondentes. Este experimento preliminar foi necessário, primeiramente, para verificar o tempo da transcrição dos genes selecionados. Além disso, também foi importante para padronização das técnicas empregadas, desde a extração de RNA até as próprias reações de RT-PCR, utilizadas nos experimentos seguintes.

Os resultados de cinética temporal dos transcritos (Fig. 9; Tab. 3), analisados nos dois meios de cultura com diferentes tempos de incubação, mostraram que os genes *phoR*, *htpX* e *pilS* são induzidos no meio M9 e no meio MCi, continuamente. Os genes relacionados ao operon *xps*, por outro lado, não foram induzidos no meio mínimo e no meio MCi. *xpsL* apresentou transcrição a partir de 9 horas enquanto *xpsE* não foi detectado em nenhum momento.

Tabela 3. Início da transcrição dos genes (em horas) em diferentes meios de cultura.

ORF	gene	Tratamentos ¹		Função hipotética
		M9	MCi	
XF 1524	<i>xpsL</i>	9	9	Secreção tipo II
XF 2592	<i>phoR</i>	3	3	Sensor efetor de fosfato
XF 2625	<i>htpX</i>	3	3	Proteína de choque térmico
XF 1517	<i>xpsE</i>	-	-	Secreção tipo II
XF 2546	<i>pilS</i>	3	3	Biossíntese de pili

¹ MCi: meio mínimo M9 com extrato de laranja doce.

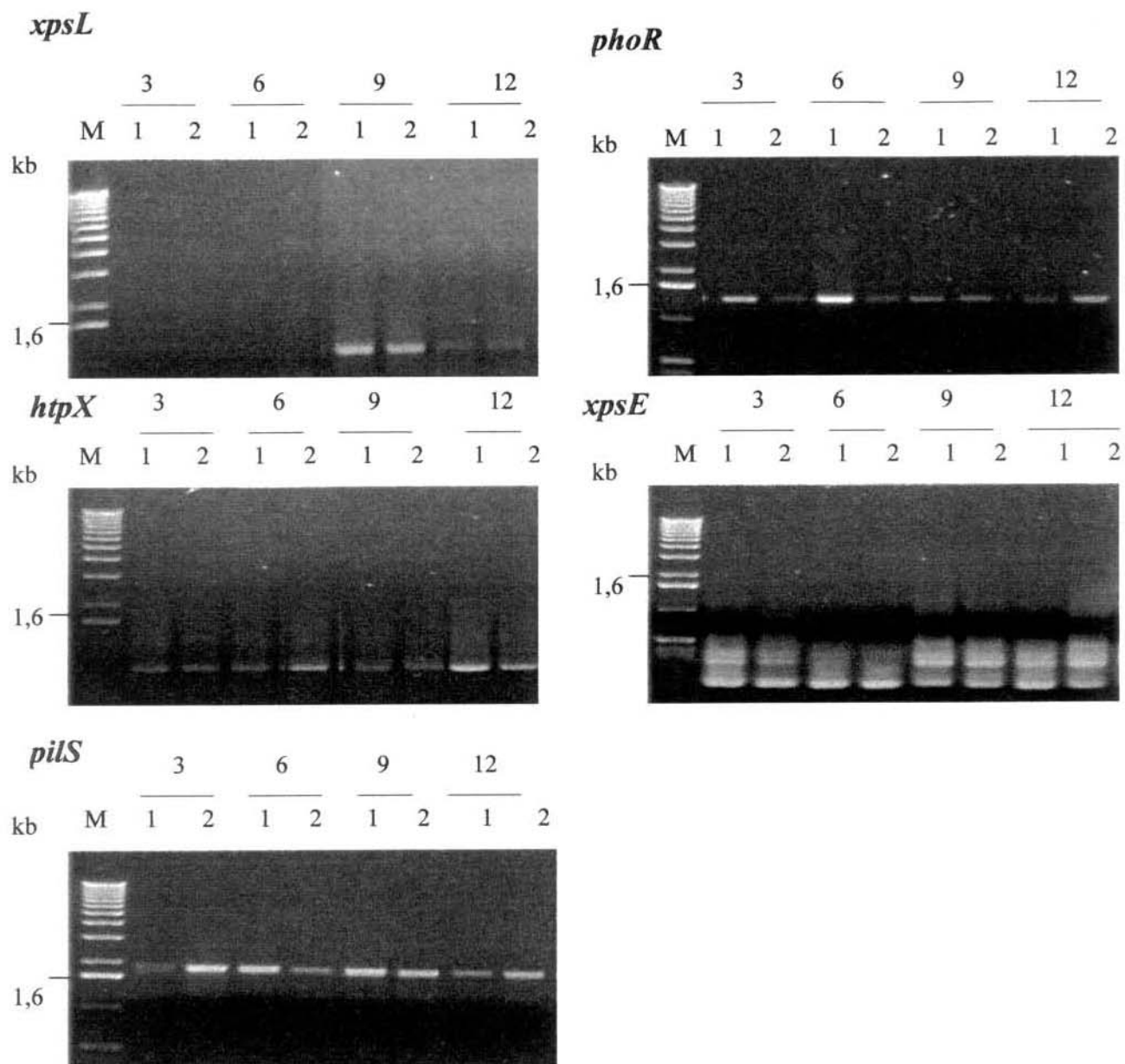


Figura 9. RT-PCR de *E. coli* recombinantes com os genes indicados, cultivadas com extrato de laranja doce em diferentes tempos (3, 6, 9 e 12 horas). 1, meio mínimo M9; 2, MCI. M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA).

As bactérias recombinantes foram então cultivadas em meio rico LB, em meio mínimo M9 e em M9 com adição de extratos de laranja doce (Ci), “Ponkan” (Po) e café (Ca), por 6 horas a 37° C. Os resultados estão apresentados na Tab. 4 e Fig. 10 e 11. Um dos genes, *xpsE*, não apresentou transcrição em nenhuma das condições, revelando diferenças em relação à sua transcrição em *X. fastidiosa*, onde foi detectado nos tratamentos com extrato de plantas, mas não em meio mínimo. Os demais genes (*xpsL*, *phoR*, *htpX* e *pilS*) foram transcritos em todos os tratamentos, de forma similar ao observado em *X. fastidiosa*.

Tabela 4. Transcrição dos genes em *E. coli* submetida a diferentes tratamentos.

ORF	gene	Tratamentos ¹					Função hipotética
		M9	M9+Ci	M9+Po	M9+Ca	LB	
XF 1524	<i>xpsL</i>	+	+	+	+	+	Secreção tipo II
XF 2592	<i>phoR</i>	+	+	+	+	+	Sensor efetor de fosfato
XF 2625	<i>htpX</i>	+	+	+	+	+	Proteína de choque térmico
XF 1517	<i>xpsE</i>	-	-	-	-	-	Secreção tipo II
XF 2546	<i>pilS</i>	+	+	+	+	+	Biossíntese de pili

¹ M9+Ci: meio mínimo M9 com extrato de laranja doce; M9+Po: meio mínimo M9 com extrato de tangerina “Ponkan”; M9+Ca: meio mínimo M9 com extrato de café.

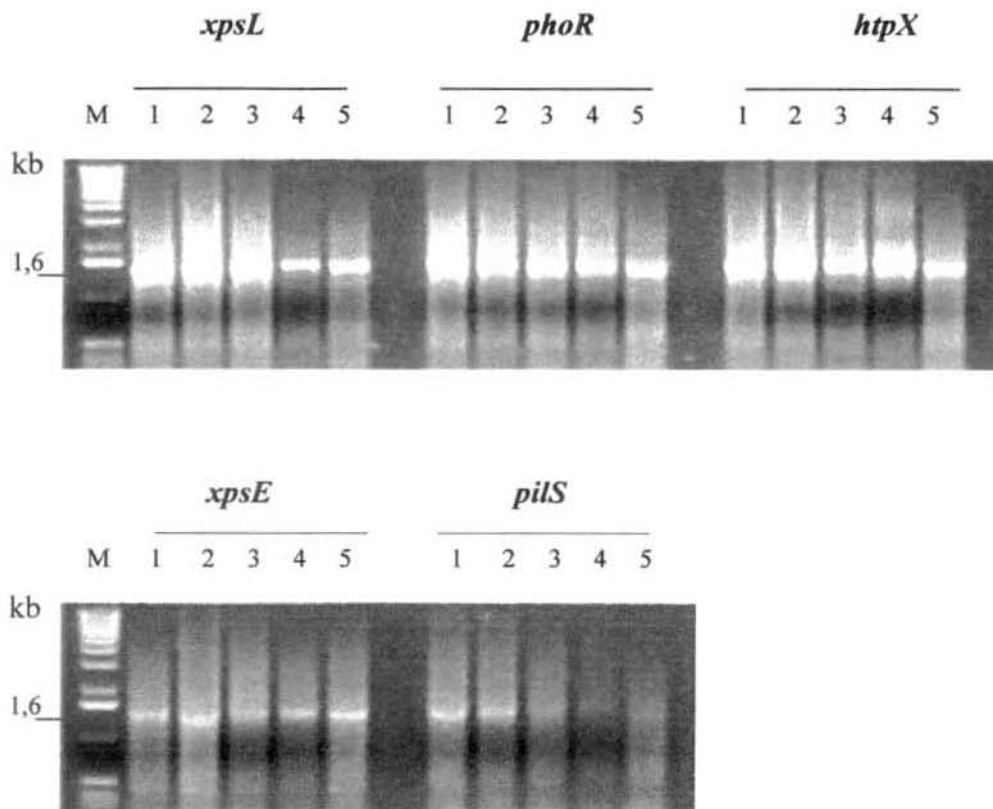


Figura 10. RT-PCR de *E. coli* submetidas a diferentes tratamentos utilizando *primer* para o gene ribossomal 16S, para verificar as concentrações dos cDNAs sintetizados. 1, meio mínimo M9; 2, M9+laranja doce; 3, M9+Ponkan; 4, M9+Café; 5, meio rico LB; M. marcador molecular 1 kb. (Invitrogen, EUA).

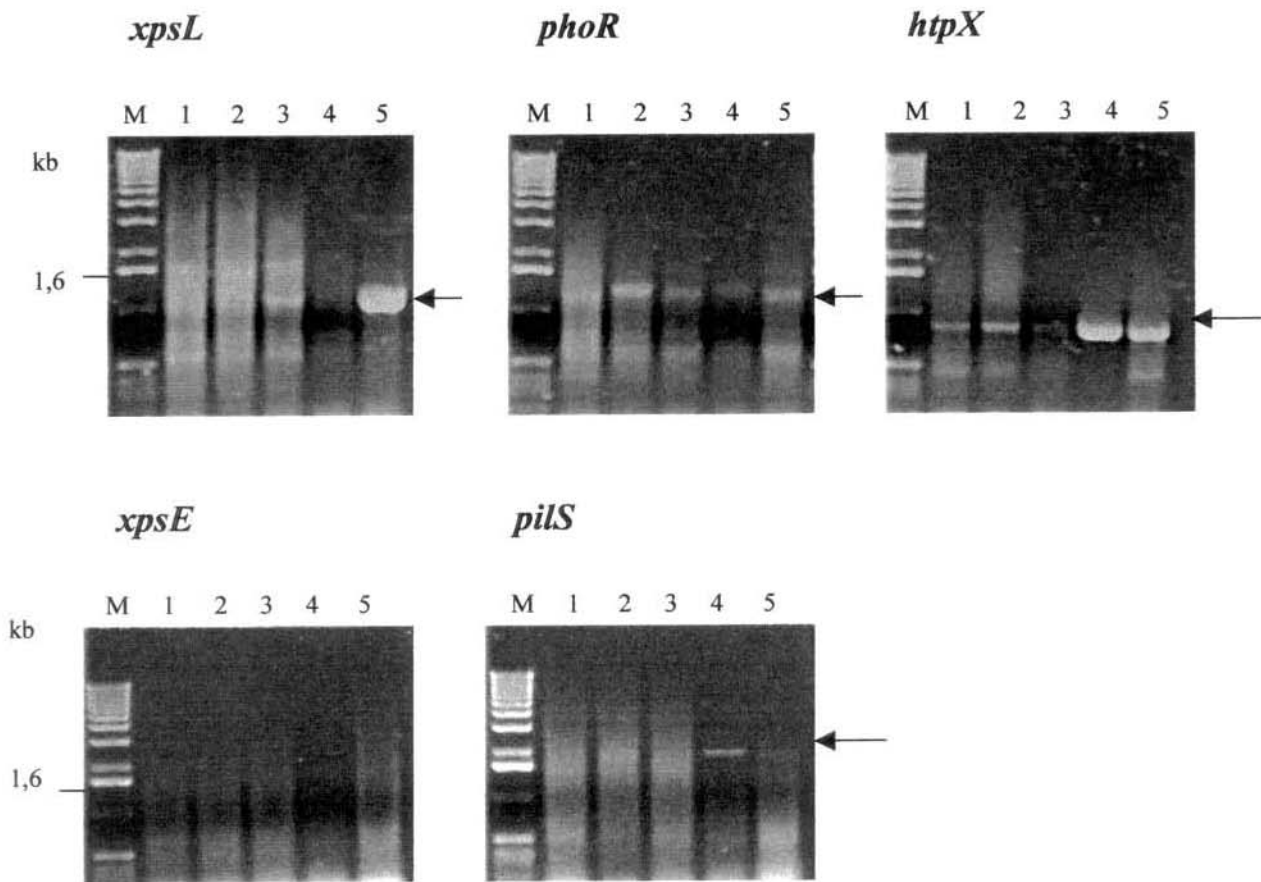


Figura 11. RT-PCR de *E. coli* submetidas a diferentes tratamentos utilizando *primers* específicos para cada gene. 1, meio mínimo M9; 2, M9+laranja doce; 3, M9+Ponkan; 4, M9+Cafê; 5, meio rico LB; M, marcador molecular 1 kb (Invitrogen, EUA).

5.3.1. Transcrição de *htpX* em *E. coli* sob diferentes temperaturas

As células recombinantes referentes à ORF XF 2625, *htpX*, foram testadas em experimento de choque térmico. A cultura com A_{600} de 0,6 foi transferida de 37°C para 45°C por diferentes períodos, 5, 10, 20 e 40 minutos e amostras de células foram coletadas para extração de RNA e reação de RT-PCR. Diferentemente do que foi observado em *X. fastidiosa*, em *E. coli* não houve aumento da transcrição deste gene sob maiores temperaturas (Fig. 12).

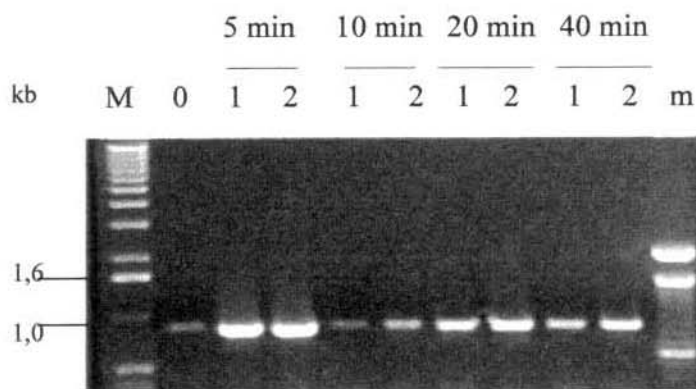


Figura 12. RT-PCR de *E. coli* com o clone referente à ORF XF 2625 (*htpX*) submetido à tratamento de choque térmico (45°C). 0, amostra retirada antes do tratamento, a 37°C; 1, cultura a 37°C; 2, cultura a 45°C; M, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen, EUA); m, marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, EUA).

5.4. Clonagem em vetor pET 32 Xa/LIC

Os *primers* PR, desenhados para amplificar as ORFs selecionadas e utilizados nos experimentos de RT-PCR, foram utilizados também para amplificar o DNA total de *X. fastidiosa* e os produtos de amplificação estão apresentados na Fig. 8B. Estes fragmentos foram purificados e tratados com T4 DNA polimerase para ligação com o vetor pET 32 Xa/LIC (Novagen, EUA). Este vetor dispensa a utilização de ligase porque os fragmentos, uma vez tratados com T4 DNA polimerase, tornam-se coesivos às extremidades do vetor linearizado, de forma que a ligação é realizada em poucos minutos. Estes plasmídios foram utilizados para transformar *E. coli* DH5 α e a inserção correta dos genes foi confirmada por sequenciamento com *primer* específico para o vetor pET 32 Xa/LIC, TRX32D (Tab. I, Anexo I). O DNA dos plasmídios recombinantes foi utilizado para transformar duas diferentes células hospedeiras de expressão, *E. coli* BL21(λ DE3) e BL21 (λ DE3) pLysS. Os lisógenos DE3 são utilizados para expressão porque possuem o gene para RNA polimerase do fago T7, sem a qual não é possível expressar o gene de interesse. A produção desta polimerase é controlada pela presença de IPTG, que, além disso, também regula a expressão do gene de interesse no plasmídio de expressão.

5.4.1. Expressão e SDS-PAGE

Os experimentos de expressão foram inicialmente padronizados com relação à célula hospedeira adequada; tempo de indução; temperatura de indução e concentração do indutor IPTG. Foram realizados experimentos com duas células de *E. coli* λ DE3, BL21 e BL21 pLysS. Após a adição de IPTG, as culturas permaneceram por 2, 4, 6 e 8 horas em

indução, visando avaliar o melhor nível de expressão das diferentes proteínas em diferentes tempos. Em alguns casos, como de HtpX, em que grande parte das proteínas são encontradas na fração insolúvel, foram também testadas temperaturas de indução mais baixas, como 20°C (Fig. 13). Entretanto, mesmo sob estas temperaturas, não ocorreu solubilização da proteína, de forma que foi mantida a indução a 37°C. A concentração do indutor IPTG também foi testada como forma de aumentar a expressão de algumas proteínas. Apenas no caso de HtpX isto resultou em aumento da expressão. Os maiores níveis de expressão foram atingidos nas condições apresentadas na Tab. 5. Duas das cinco proteínas testadas apresentaram super-expressão em SDS-PAGE (Fig. 14) e XpsL foi detectada nos experimentos de Western blot (Fig. 15).

Tabela 5. Condições de expressão padronizadas.

ORF	Gene	Célula Hospedeira	[IPTG]	T°C de indução	Tempo de indução	Fração predominante
XF 1524	<i>xpsL</i>	BL21pLysS	1 mM	37°C	4 horas	insolúvel
XF 2592	<i>phoR</i>	BL21pLysS	1 mM	37°C	2-4 horas	insolúvel
XF 2625	<i>htpX</i>	BL21pLysS	2 mM	37°C	3 horas	insolúvel

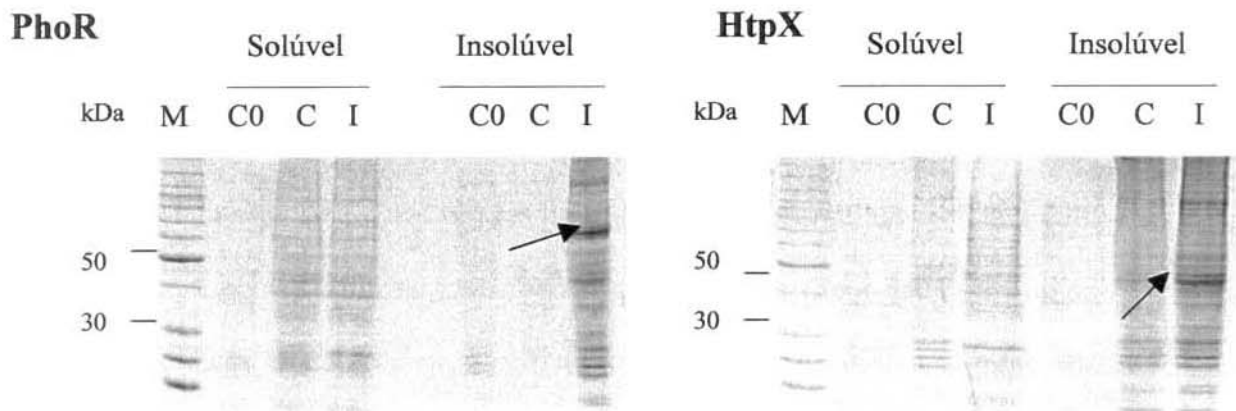


Figura 13. Expressão das proteínas PhoR e HtpX a 20°C por 16 horas com 1 mM e 2 mM de IPTG, respectivamente. SDS-PAGE de proteínas das frações solúvel e insolúvel de *E. coli*. C0. controle antes da indução; C. cultura não induzida após 16 horas; I. cultura induzida por 16 horas. M, marcador de peso molecular Benchmark (Invitrogen, EUA). As setas indicam as proteínas expressas.

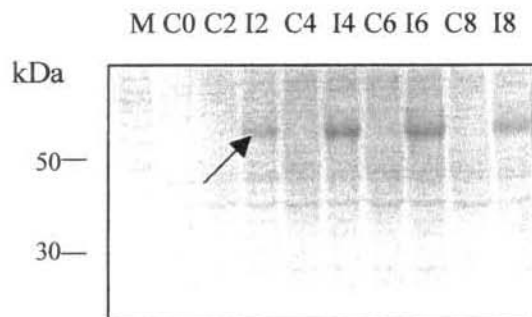


Figura 14. SDS-PAGE de proteínas totais de *E. coli* BL21(λDE3)pLysS com o gene *phoR*. C, controle; I, cultura induzida com 1 mM IPTG. Os números indicam o tempo de indução (em horas); M, marcador molecular Benchmark (Invitrogen, EUA).

5.4.2. Western blot

Para confirmar a fusão das proteínas expressas com os resíduos de histidina presentes no vetor de expressão, foi realizado Western blot utilizando anticorpo anti-His tag. O anticorpo utilizado (Santa Cruz Biotechnology, EUA) reconhece caudas de polihistidinas presente nos vetores pET. As células recombinantes foram cultivadas e induzidas por 4 horas conforme mencionado anteriormente (item 5.4.1), seguindo-se a extração de proteínas totais de acordo com Jackman (1985). As proteínas totais foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE seguindo-se a transferência para membranas de nitrocelulose. Os resultados revelaram que três das cinco proteínas estudadas (XpsL, PhoR e HtpX) foram corretamente inseridas e expressas no vetor pET 32 Xa/LIC (Fig. 15), já que as bandas correspondentes possuíam o tamanho da proteína de interesse somada à fusão (de aproximadamente 13 kDa). Com relação a PhoR foram observadas outras bandas, que podem ser resultado de degradação. Desta maneira, estudos posteriores poderão utilizar estas construções para purificação destas proteínas a partir de colunas de afinidade a cauda de histidina.

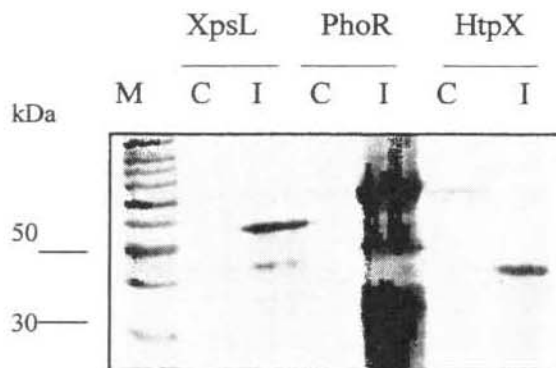


Figura 15. Western blot de proteínas totais de *E. coli* com os clones XpsL, PhoR e HtpX utilizando anticorpo anti-His tag. C, cultura não induzida; I, cultura induzida por 4 horas; M, marcador de peso molecular Benchmark (Invitrogen, EUA).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo analisar a expressão, ao nível transcricional, de diferentes genes de *X. fastidiosa*. Os genes estudados foram selecionados com base na suposta capacidade de sofrer alterações de acordo com o meio de crescimento, seja da planta hospedeira ou das condições de cultivo. Os resultados obtidos para cada gene serão discutidos a seguir, separadamente.

xpsL e *xpsE*

Em *X. fastidiosa*, os genes *xpsL* e *xpsE* estão situados em uma região do cromossomo que inclui um complexo de genes relacionados ao sistema de secreção do tipo II e potencialmente envolvidos com patogenicidade. A similaridade desses genes com o cluster *xps* de *Xanthomonas campestris* já foi observada quando da anotação do genoma (Simpson *et al.* 2000). O cluster de genes *xps* (*X*anthomonas *p*rotein *s*ecretion) é relativamente bem caracterizado em *Xanthomonas* (Dums *et al.*, 1991, Salmond, 1994, Russel, 1998) e sua função está ligada à secreção de uma série de enzimas extracelulares, que degradam o tecido vegetal. Estes genes possuem homólogos em uma série de outras bactérias como os *gsp* em *Pseudomonas aeruginosa*, os *out* em *Erwinia* sp. e os *pul* em *Klebsiella oxytoca* (Lee *et al.*, 2001). O mecanismo de secreção tipo II, comum em muitas bactérias Gram-negativas, consiste em 2 etapas: na primeira as enzimas extracelulares são transportadas através da membrana citoplasmática para o periplasma via sistema Sec, e, na segunda etapa, estas enzimas são exportadas para fora das células com o auxílio das

proteínas codificadas pelo cluster *xps*. Em todos os casos, as proteínas secretadas possuem uma sequência N-terminal típica processada no periplasma.

Alguns estudos revelaram que a maior parte das proteínas que compõe o sistema de secreção tipo II são integrais de membrana, de forma que criam um canal por onde podem passar as proteínas secretadas (Russel, 1998). Entre estas está a proteína L (XpsL), que forma um complexo com outras proteínas na membrana, mas não a E (XpsE), que é citoplasmática (Russel, 1998). Em *Xanthomonas campestris*, XpsL e XpsM formam um complexo na membrana e são dependentes entre si, ou seja, a ausência de uma delas impede a produção da outra (Lee *et al.*, 2001).

Em *X. fastidiosa*, os dois genes, *xpsL* e *xpsE*, são transcritos em meio rico, PW, e na presença dos extratos de “Ponkan” e café, mas não em meio mínimo. No meio com extrato de laranja doce não foi detectada a presença de *xpsL*, mas *xpsE* está presente. Estes resultados indicam que componentes comuns, capazes de induzir a transcrição destes genes, estão presentes nos extratos de plantas e no meio PW, mas não em extrato de laranja doce. A composição do extrato das plantas não é bem conhecida, entretanto sabe-se que contém níveis variáveis de aminoácidos, açúcares e compostos fenólicos (Kishore & Chand, 1973, 1976). Testes posteriores com alguns destes componentes isolados poderiam fornecer indicações dos reguladores específicos para os genes *xps*.

Em *E. coli*, a regulação destes genes apresentou-se distinta de *X. fastidiosa*. *xpsL* foi transcrito em todas as condições estudadas, nos meios M9 e LB e também nos meios com adição de extratos. *xpsE*, por outro lado, não foi transcrito em nenhuma destas condições, nem mesmo nos experimentos de cinética, realizados por 12 horas em meio M9. Os dois genes pertencem a um único operon e, portanto, devem ser transcritos de forma coordenada, obedecendo a uma regulação comum. Desde que *xpsL* é transcrito em todas as

condições testadas, os sinais necessários para sua indução (ou “desrepressão”) devem estar presentes nos meios de cultura, possivelmente nos mais ricos. Entretanto, como *xpsE* não apresenta nenhum transcrito, é razoável a suposição de que esse gene necessite de fatores adicionais, ou, ainda, que ele seja dependente da expressão de outras proteínas do complexo membranas, desde que a interação entre XpsL e XpsE foi comprovada por estudos de duplo-híbrido (Lee *et al.*, 2001).

Estes resultados indicam que *xpsL* e *xpsE* são capazes de responder a estímulos nutricionais, já que são detectados em meios ricos com maior frequência. Isto sugere um vínculo entre o estado nutricional da bactéria e a expressão dos genes *xps*, que, ao propiciarem a secreção de enzimas estão, na verdade, iniciando o processo de degradação de tecidos da planta. Além destes estímulos “comuns” aos *xps*, alguns fatores específicos são necessários, uma vez que, isoladamente, *xpsE* não foi transcrito em nenhuma condição de meio de cultura em *E. coli*. Estudos futuros com outros componentes do operon *xps* utilizando frações dos extratos de planta poderão elucidar o mecanismo de ativação destes genes.

Regulon *pho*

A transdução de sinal é um mecanismo bastante utilizado por bactérias para detectar estímulos ambientais. Alterações de meio, nutrientes e temperatura são capazes de regular determinadas proteínas transmembranares, as quais, uma vez ativadas, podem atuar sobre outra(s) proteína(s) no citoplasma. Esta segunda proteína pode então funcionar como reguladora da expressão de outros genes, possivelmente envolvidos com a adaptação à condição em que a bactéria se encontra. Proteínas sensoras de estímulos ambientais são, desta maneira, importantes no estudo da interação da bactéria com o meio em que se

encontra. É provável que o ambiente dentro da planta possua estímulos característicos, detectados pela bactéria através destas proteínas sensoras, desencadeando uma série de processos relacionados à interação com o hospedeiro.

O gene *phoR* faz parte de um sistema sensor-efetor ativado durante ausência de fosfato inorgânico em microrganismos como *Bacillus subtilis* e *E. coli* (Scholten & Tommassen, 1993; Shi & Hulett, 1999). *phoR* codifica uma histidina-quinase e é um dos responsáveis pela ativação do regulon *pho*, composto por cerca de 30 genes, todos relacionados ao suprimento de fosfato na célula. Em *X. fastidiosa*, além de *phoR*, também são encontrados genes homólogos ao regulon *pho*, *phoA*, *phoB*, *phoU*, além de outro sistema sensor-efetor composto por *phoQ/phoP*. Os resultados apresentados indicam que *phoR* é continuamente transcrito em *E. coli* e em *X. fastidiosa*, em todas as condições testadas.

Com o objetivo de estudar melhor a regulação do metabolismo de fosfato em *X. fastidiosa*, foram testadas concentrações variáveis deste componente no meio de cultura. Estudos anteriores utilizando *E. coli* como modelo indicaram que 0,1 mM é uma concentração suficientemente baixa para induzir uma resposta por ausência de fosfato e que, a partir de 1 mM, a concentração deixa de ser crítica para a célula (Willsky *et al.*, 1973; Willsky & Malamy, 1976). Assim, foram testadas concentrações entre 0 (XDM*0) e 2,9 mM (XDM*0,4) de fosfato. Não foi possível observar, com os resultados obtidos pelo RT-PCR, nenhuma alteração na transcrição de *phoR* e de outros genes supostamente sob seu controle: *phoU*, *phoA* e *phoB*. Ao contrário do esperado, o transcrito *phoR* pode ser detectado mesmo sob concentrações mais altas de KH_2PO_4 . O mesmo foi observado com relação a *phoQ* e *phoP*, de forma que este sistema também não respondeu aos níveis alterados de PO_4 . O meio mínimo XDM possui concentração de fosfato equivalente a 1,69

mM, o que, de acordo com Willsky *et al.* (1973) deixa de ser nível crítico de ausência de P_i , assim, esses genes deveriam ser reprimidos. Mesmo na presença de altas concentrações de P_i , como no meio de cultura PW (14,1 mM de fosfato) e M9 (cerca de 340 mM de fosfato), este gene é transcrito continuamente. Além disso, a substituição de pirofosfato férrico por cloreto de hemin não apresentou nenhum efeito na transcrição desses genes, o que também reforça a idéia de que outro efeito ambiental possa estar regulando este gene em *X. fastidiosa*.

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que *phoR* de *X. fastidiosa* não deve estar envolvido com o sistema sensor de fosfato, conforme anotação do genoma, diferindo consideravelmente do sistema de transdução descrito em *B. subtilis* e *E. coli* (Scholten & Tommassen, 1993; Shi & Hulett, 1999). O sistema de detecção de níveis de fosfato pode, ainda, estar sob controle de outros genes ainda não anotados no genoma, desde que transcritos de um segundo sistema testado, *phoQ* e *phoP*, mostraram-se também insensíveis às diferentes concentrações de fosfato. É preciso considerar, ainda, o fato de que *X. fastidiosa* é uma bactéria restrita ao xilema, e que talvez neste ambiente a adaptação a níveis de fosfato não seja crítica, de forma que estes genes não estariam diretamente envolvidos com sistemas sensores.

pilS

O gene *pilS* também faz parte de um sistema sensor-efetor em *X. fastidiosa*, envolvido com a regulação da expressão da fímbria tipo IV. O papel das fímbrias e adesinas tem sido considerado importante na interação de *X. fastidiosa* com a planta hospedeira (Dow & Daniels, 2000; Machado *et al.*, 2001). Isto porque estes elementos podem ser

necessários para adesão da bactéria no tecido vascular da planta, causando a oclusão do sistema de transporte do xilema, e também para adesão no cibário do inseto-vetor.

Em patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, PilS é uma proteína interna de membrana e ainda não é conhecido o sinal capaz de ativá-la. Talvez uma condição ambiental específica, podendo até estar relacionada ao estado nutricional, que requeira atividade de adesão, seja capaz de induzir sua expressão (Wu & Kaiser, 1997; O'Toole & Kolter, 1998; Boyd, 2000). De acordo com Boyd & Lory (1996), PilS possui dois domínios sensores, um deles compreende as hélices transmembranares e é responsável pelos sinais na membrana, o outro, localizado entre as hélices e o domínio quinase, é sensível aos sinais provenientes do citoplasma. Uma vez ativada, PilS fosforila PilR, de forma similar ao que ocorre no regulon *pho*, descrito anteriormente. PilR fosforilado, por sua vez, é capaz de atuar na transcrição de PilA, uma das subunidades da pilina, responsável pela formação dos apêndices de superfície (Boyd *et al.*, 1994; Boyd & Lory, 1996; Ethier & Boyd, 2000; Winther-Larsen & Koomey, 2002).

O estudo da transcrição de *pilS* revelou perfis similares em *X. fastidiosa* e *E. coli*. Em *X. fastidiosa*, este transcrito foi observado em todas as condições com exceção do meio mínimo XDM. Estes resultados confirmam a proposição de que o estado nutricional seja capaz de regular a transcrição deste gene (O'Toole & Kolter, 1998), já que foi detectado em presença de meios mais ricos. Em *E. coli* uma situação similar foi observada, com a diferença de que *pilS* foi observado também em meio mínimo, M9, conforme já havia sido observado nos experimentos preliminares de cinética. A transcrição de *pilS* parece, desta maneira, estar sendo regulada por fatores presentes em meios mais ricos, como PW e LB e pela presença de extratos de plantas. O maior crescimento da bactéria nestes meios pode levar a formação de agregados celulares e de biofilmes (Marques *et al.*, 2002). A presença

de pili neste caso seria bastante importante para ligação entre as células, o que pode explicar a transcrição de *pilS* nestes meios.

htpX

O gene *htpX* faz parte do regulon *htp*, que controla diversos operons relacionados a resposta *heat-shock* de *E. coli* (Neidhardt *et al.*, 1983). Kornitzer *et al.* (1991) relatam que os genes da resposta de *heat-shock* (*hsp*), entre eles o *htpX*, são induzidos por aumento de temperatura e, aparentemente, estariam relacionados a degradação de proteínas com conformação anormal. O experimento de choque térmico em *X. fastidiosa* foi capaz de ativar a transcrição deste gene na condição de maior temperatura em meio XDM após 8 horas. Entretanto, no meio PW, o gene foi transcrito de forma constitutiva nas duas temperaturas utilizadas. Com a maior multiplicação celular de *X. fastidiosa* em meio rico, um maior número de proteínas são sintetizadas, aumentando a frequência de eventos de proteólise, para os quais estes genes seriam requisitados. Os resultados indicam que *htpX* de *X. fastidiosa* está sob controle da temperatura em meio mínimo mas em meios complexos outros fatores, nutricionais ou relacionados à densidade celular, podem estar envolvidos.

A regulação de proteínas do tipo “heat-shock” em *E. coli* é mais conhecida e sabe-se que outras condições ambientais, como pH elevado, ausência de nutrientes e etanol podem estimular a transcrição destes genes (Weiner & Model, 1994; Raivio & Silhavy, 2001; Shimohata *et al.*, 2002). Em *E. coli*, foi possível observar a transcrição de *htpX* em todos os tratamentos realizados, inclusive no experimento de cinética, onde ocorreu transcrição contínua deste gene. Até mesmo quando foi alterada a temperatura de incubação para 45°C este gene foi transcrito continuamente. É possível que a região regulatória deste gene em *X. fastidiosa*, clonada junto com a ORF em *E. coli*, seja sensível a maior

temperatura de incubação, 37°C, fazendo com que esta ORF seja transcrita continuamente em *E. coli*.

Finalmente, poucos estudos com expressão de genes de *X. fastidiosa* foram realizados. Apenas recentemente foi publicado um estudo de expressão global de genes de *X. fastidiosa* utilizando *microarray*, em que foram identificados genes super-expressos (Nunes *et al*, 2003). Os resultados do presente trabalho, no entanto, apresentam a expressão de outros genes sujeitos à regulação por diferentes condições de cultura.

Expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*

Em uma segunda etapa do trabalho, as ORFs selecionadas foram clonadas em vetores de expressão em *E. coli*. A expressão das proteínas heterólogas correspondentes será discutida a seguir.

Três proteínas de *X. fastidiosa* foram corretamente expressas em *E. coli*, XpsL, PhoR e HtpX. A expressão de outras duas proteínas também foi testada, entretanto, não foi possível detectar sua presença em géis SDS-PAGE ou através de experimentos de Western blot utilizando anticorpo anti-His tag. Isto sugere que as proteínas XpsE e PilS apresentam expressão reprimida em *E. coli*, o que pode ser devido à toxicidade de seus produtos. De fato, em alguns casos a proteína pode ter sua expressão reduzida ou mesmo reprimida se os produtos forem tóxicos para a bactéria hospedeira (Makrides, 1996).

XpsL, PhoR e HtpX foram detectadas na fração insolúvel do extrato celular e sua presença foi confirmada pela massa molecular e pelos experimentos de Western blot. A produção de proteínas insolúveis em *E. coli* pode ser devida a alta taxa de expressão, o que levaria à sua “compartimentalização” em corpúsculos no citoplasma (Sachdev & Chirgwin,

1998). A presença da tiorredoxina (Trx) fusionada à proteína alvo e a diminuição da temperatura de indução não foram suficientes para induzir uma melhor solubilização destas proteínas. De acordo com algumas previsões, realizadas a partir da estrutura primária e utilizando o modelo de Kyte & Doolittle (1982), as três proteínas possuem resíduos hidrofóbicos que podem interferir na sua solubilidade.

Os resultados de Western blot confirmaram, através da massa molecular estimada das proteínas somadas à fusão de 13 kDa, a presença dos resíduos de histidina, que são importantes nas etapas futuras de purificação. No caso de XpsL, é provável que outros fatores estejam interferindo na sua expressão, já que esta proteína não apresentou super-expressão em géis de SDS-PAGE, tendo sido detectada somente nos ensaios de Western blot. Talvez o nível de expressão não seja suficientemente alto para ser detectado por SDS-PAGE. É interessante notar que a super-expressão foi observada para PhoR e HtpX, duas proteínas que possuem homólogos em *E. coli*.

Com relação a PhoR, bandas de menor tamanho também foram observadas nos resultados de Western blot, indicando uma possível degradação da proteína devido à sua instabilidade ou à presença de proteases da própria *E. coli*, que podem ser induzidas na presença de proteínas heterólogas (Schweder *et al.*, 2002). Algumas tentativas preliminares de purificação de PhoR foram realizadas utilizando cromatografia de afinidade. Foram utilizadas as colunas de níquel e de cobalto, que possuem afinidade aos resíduos de His fusionados à proteína, e as purificações foram realizadas a temperatura ambiente e a 4°C. Também foram testados diferentes protocolos de solubilização da proteína, utilizando agentes desnaturantes como uréia e guanidina. Nenhuma das tentativas, entretanto, foi bem-sucedida para purificação desta proteína. Em etapas futuras, novas abordagens para purificação desta e das demais proteínas deverão ser efetuadas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da transcrição de genes de *X. fastidiosa* em dois sistemas diferentes revelou importantes características a respeito de sua regulação. De maneira geral, os genes foram transcritos em meios com mais nutrientes, mais ricos. Estes resultados sugerem que o estado nutricional de *X. fastidiosa* interfere na transcrição de seus genes.

Os genes do cluster *xps*, *xpsL* e *xpsE*, foram transcritos em meios mais ricos. *xpsE* não foi detectado em *E. coli*, sugerindo que a sua transcrição possa estar vinculada à presença de outros fatores, além dos nutricionais. Testes posteriores com componentes dos extratos de planta ou mesmo do xilema poderão elucidar o mecanismo de regulação de *xpsE*. A transcrição de *pilS* também foi observada em meios mais ricos. Nestes meios há maior proliferação celular e, com isso, ocorre a formação de agregados celulares permitindo a formação de biofilmes, observados na bactéria.

O gene *phoR*, por sua vez, não apresentou diferenças na sua transcrição com relação aos diferentes meios. Este gene, ao contrário do que foi previsto pela anotação do genoma, não respondeu a níveis alterados de fosfato no meio, de forma que, possivelmente, este componente não é diretamente responsável por sua regulação. Isto é coerente com os resultados obtidos para os outros genes do regulon *pho*, também testados neste trabalho. É possível que este sistema em *X. fastidiosa* seja capaz de responder a outros estímulos, ainda não detectados e que outros genes, ainda desconhecidos, atuem no metabolismo de fosfato nesta bactéria.

A resposta de choque térmico em *X. fastidiosa* parece estar relacionada ao transcrito *htpX*, uma vez que foi possível notar a ativação de sua transcrição sob maiores

temperaturas. É possível que, assim como em *E. coli*, este gene também responda a outros estresses, como ausência de nutrientes.

Em etapas futuras, serão necessários experimentos *in vivo* para verificar a transcrição destes genes. Além disso, a purificação das proteínas XpsL, PhoR e HtpX, expressas em *E. coli* neste trabalho, poderá auxiliar no estudo de suas funções. O mecanismo de ativação/repressão destes genes poderá ser melhor compreendido através de estudos de interação entre proteínas de *X. fastidiosa*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beretta, M.J.G., Harakava, R. and Chagas, C.M. (1996) First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Disease*, **80**, 821-821.
- Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Ivanova, N., D'Souza, M., Bernal, A., Lykidis, A., Kapatral, V., Anderson, L., Larsen, N., Los, T., Reznik, G., Selkov, E., Walunas, T.L., Feil, H., Feil, W.S., Purcell, A., Lassez, J.L., Hawkins, T.L., Haselkorn, R., Overbeek, R., Predki, P.F. and Kyrpides, N.C. (2002a) Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 12403-12408.
- 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., Walunas, T.L., Purcell, A., Edwards, R.A., Hawkins, T., Haselkorn, R., Overbeek, R., Kyrpides, N.C. and Predki, P.F. (2002b) Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Research*, **12**, 1556-1563.
- Bonas, U. (1994). *hrp* Genes of Phytopathogenic Bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **192**, 79-98.
- Boyd, J.M. (2000) Localization of the histidine kinase PilS to the poles of *Pseudomonas aeruginosa* and identification of a localization domain. *Molecular Microbiology*, **36**, 153-162.
- Boyd, J.M., Koga, T. and Lory, S. (1994) Identification and Characterization of PilS, an Essential Regulator of *Pilin* Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & General Genetics*, **243**, 565-574.
- Boyd, J.M. and Lory, S. (1996) Dual function of PilS during transcriptional activation of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin subunit gene. *Journal of Bacteriology*, **178**, 831-839.
- Chang, C.J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V. and Bove, J.M. (1993) Culture and Serological Detection of the Xylem-Limited Bacterium Causing Citrus Variegated Chlorosis and Its Identification as a Strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, **27**, 137-142.

- da Silva, F.R., Vettore, A.L., Kemper, E.L., Leite, A. and Arruda, P. (2001) Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters*, **203**, 165-171.
- de Oliveira, R.C.; Yanai, G.; Muto, N.H.; Leite, D.B.; Souza, A.A.; Coletta-Filho, H.D.; Machado, M.A. and Nunes, L.R. (2002). Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analysis of *Xylella fastidiosa* strains. *FEMS Microbiology Letters*, **216**, 15-21.
- Davis, M.J., French, W.J. and Schaad, N.W. (1981) Axenic Culture of the Bacteria Associated with Phony Disease of Peach and Plum Leaf Scald. *Current Microbiology*, **6**, 309-314.
- Dow, J.M. and Daniels, M.J. (2000) *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast*, **17**, 263-271.
- Dums, F.; Dow, J.M. and Daniels, M.J. (1991) Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other gram-negative bacteria. *Molecular and General Genetics*, **229**, 357-364.
- Ethier, J. and Boyd, J.M. (2000) Topological analysis and role of the transmembrane domain in polar targeting of Pils, a *Pseudomonas aeruginosa* sensor kinase. *Molecular Microbiology*, **38**, 891-903.
- Ferreira, H., Neto, J.R., Goncalves, E.R. and Rosato, Y.B. (1999) A simplified subtractive hybridization protocol used to isolate DNA sequences specific to *Xylella fastidiosa*. *Microbiology-Uk*, **145**, 1967-1975.
- French, W.J., Stassi, D.L. and Schaad, N.W. (1978) Use of Immunofluorescence for the Identification of Phony Peach Bacterium. *Phytopathology*, **68**, 1106-1108.
- Goeddel, D. (1990) Systems for Heterologous Gene Expression. *Methods in Enzymology*, **185**, 3-7.
- Goheen, A.C., Nyland, G. and Lowe, S.K. (1973) Association of a Rickettsia-Like Organism with Pierce's Disease of Grapevines and Alfalfa Dwarf and Heat Therapy of Disease in Grapevines. *Phytopathology*, **63**, 341-345.
- Gottesman, S. and Maurizi, M.R. (1992) Regulation by Proteolysis - Energy-Dependent Proteases and Their Targets. *Microbiological Reviews*, **56**, 592-621.

- Hendson, M., Purcell, A.H., Chen, D.Q., Smart, C., Guilhabert, M. and Kirkpatrick, B. (2001) Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 895-903.
- Hobbs, M., Collie, E.S.R., Free, P.D., Livingston, S.P. and Mattick, J.S. (1993) PilS and PilR, a Two-Component Transcriptional Regulatory System Controlling Expression of Type-4 Fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, **7**, 669-682.
- Hopkins, D.L. (1988) Production of Diagnostic Symptoms of Blight in Citrus Inoculated with *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, **72**, 432-435.
- Hopkins, D.L. (1989) *Xylella fastidiosa* - Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. *Annual Review of Phytopathology*, **27**, 271-290.
- Hopkins, D.L. and Mollenhauer, H.H. (1973) Rickettsia-Like Bacterium Associated with Pierce's Disease of Grapes. *Science*, **179**, 298-300.
- Hopkins, D.L. and Purcell, A.H. (2002) *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease*, **86**, 1056-1066.
- Jackman, P.J.H. (1985) Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp.115-129. Edited by M. Goodfellow & D.E. Minnikin. London: Academic Press.
- Jindal, K.K. and Sharma, R.C. (1987) Outbreaks and new records: India almond leaf scorch, a new disease from India. *FAO Plant Protection Bulletin*, **35**, 64-65
- Kamper, S.M.; French, W.J. and De Kloet, S.R. (1985) Genetic Relationships of some fastidious xylem-limited bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **35**, 185-188.
- Kishore, V. and Chand, J.N. (1973). Resistance of citrus to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* (Hesse) Dowson: analysis of amino acids. *Haryana Journal of Agricultural Sciences*, **2**, 46-49.
- Kishore, V. and Chand, J.N. (1976) Resistance of citrus to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* - analysis of phenols and sugars. *Indian Phytopathology*, **28**, 46-47.
- Koebnik, R. (2001) The role of bacterial *pili* in protein and DNA translocation. *Trends in Microbiology*, **9**, 586-590.

- Kornitzer, D., Teff, D., Altuvia, S. and Oppenheim, A.B. (1991) Isolation, Characterization, and Sequence of an Escherichia- Coli Heat-Shock Gene, *htpX* *Journal of Bacteriology*, **173**, 2944-2953.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *Journal of Molecular Biology*, **157**, 105-132.
- Lambais, M.R., Goldman, M.H.S., Camargo, L.E.A. and Goldman, G.H. (2000) A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, **3**, 459-462.
- Laranjeira, F.F.; Pompeu Jr., J; Harakawa, R.; Figueiredo, J.O.; Carvalho, S.A. and Coletta-Filho, H.D. (1998). Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, **23**, 147-154.
- Leach, J.E. and White, F.F. (1996). Bacterial Avirulence Genes. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 153-79.
- Lee, H.M., Tyan, S.W., Leu, W.M., Chen, L.Y., Chen, D.C. and Hu, N.T. (2001) Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-XpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *Journal of Bacteriology*, **183**, 528-535.
- Lee, R.F.; Raju, B.C.; Nyland, C. and Goheen, A.C. (1982). Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology*, **72**, 886-888.
- Leigh, J.A. and Coplin, D.L. (1992). Exopolysaccharides in Plant-Bacterial Interactions. *Annual Review of Microbiology*, **46**, 307-46.
- Leite, Jr, R.P. and Leite, R.M.V.B.C. (1991) Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. *Summa Phytopathologica*, **17**, 7.
- Leite, R. M. V. B. C., Stall, R. E., Hopkins, D. L. and Minsavage, G. V. (1993) Caracterização de estirpes de *Xylella fastidiosa* visando a otimização da reação de PCR para diagnóstico da CVC. *Summa Phytopathologica*, **19**, 46.
- Lemos, E.G.M.; Alves, L.M.C. and Campanharo, J.C. (2003). Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology Letters*, **219**, 39-45.
- Leu, L.S. and Su, C.C. (1993) Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch in Taiwan. *Plant Disease*, **77**, 642-646.

- Lindgren, P.(1997) The role of *hrp* genes during Plant-Bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **35**: 129-152.
- Lopes, S.A., Ribeiro, D.M., Roberto, P.G., Franca, S.C. and Santos, J.M. (2000) *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Disease*, **84**, 827-830.
- Machado, M.; Souza, A.A.; Coletta Filho, H.D.; Kuramae, E.E. and Takita, M.A. (2001) Genome and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Molecular Biology Today*, **2**, 33-43.
- Makrides, S.C. (1996). Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, **60**,512-538.
- Marques, L.L.R., Ceri, H., Manfio, G.P., Reid, D.M. and Olson, M.E. (2002) Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant Disease*, **86**, 633-638
- Mattick, J.S. (2002) Type IV *pili* and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, **56**, 289-314.
- Mehta, A., Leite, R.P. and Rosato, Y.B. (2001) Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer and rep-PCR fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **79**, 53-59.
- Minsavage, G.V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R. and Stall, R.E. (1994) Development of a Polymerase Chain-Reaction Protocol for Detection of *Xylella fastidiosa* in Plant-Tissue. *Phytopathology*, **84**, 456-461.
- Mircetich, S.M., Lowe, S.K., Moller, W.J. and Nyland, G. (1976) Etiology of Almond Leaf Scorch Disease and Transmission of Causal Agent. *Phytopathology*, **66**, 17-24.
- Mollenhauer, H.H. and Hopkins, D.L. (1976) Xylem Morphology of Pierce's Disease-Infected Grapevines with Different Levels of Tolerance. *Physiological Plant Pathology*, **9**, 95-100.
- Neidhardt, F.C., Vanbogelen, R.A. and Lau, E.T. (1983) Molecular-Cloning and Expression of a Gene That Controls the High-Temperature Regulon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **153**, 597-603.

- Nunes, L.R.; Rosato, Y.B.; Muto, N.H.; Yanai, G.H.; da Silva, V.S.; Leite, D.B.; Gonçalves, E.R.; de Souza, A.A.; Colleta-Filho, H.D.; Machado, M.A.; Lopes, S.A. and de Oliveira, R.C. (2003). Microarray analysis of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. *Genome Research*, **13**, 570-578.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, **30**, 295-304
- Paradela Filho, O.; Sugimori, M.H.; Ribeiro, I.J.A.; Garcia Junior, A.; Beretta, M.J.G.; Harakawa, R.; Machado, M.A.; Laranjeira, F.F.; Rodrigues Neto, J. and Beriam, L.O. (1997) Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. *Summa Phytopathologica*, **23**,46-49.
- Pooler, M.R. and Hartung, J.S. (1995) Specific PCR Detection and Identification of *Xylella-Fastidiosa* Strains Causing Citrus Variegated Chlorosis. *Current Microbiology*, **31**, 377-381.
- Purcell, A.H. and Hopkins, D.L. (1996) Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 131-151.
- Purcell, A.H., Saunders, S.R., Hendson, M., Grebus, M.E. and Henry, M.J. (1999) Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Phytopathology*, **89**, 53-58.
- Queiroz-Voltan, R.B and Paradela-Filho, O. (1999) Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. *Laranja*, **20**, 55-76.
- Raivio, T.L., Popkin, D.L. and Silhavy, T.J. (1999) The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *Journal of Bacteriology*, **181**, 5263-5272.
- Raivio, T.L. and Silhavy, T.J. (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 591-624.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in Microbiology*, **8**, 498-504

- Rosato, Y.B., Neto, J.R., Miranda, V.S., Carlos, E.F. and Manfio, G.P. (1998) Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by Citrus variegated chlorosis in Brazil. *Systematic and Applied Microbiology*, **21**, 593-598.
- Rossetti, V.; Garnier, M.; Beretta, M.J.G.; Teixeira, A.R.R.; Quaggio, J.A.; Battaglia, O.C.; Gomes, M.P.; De Negri, J.O. and Bové, J.M.(1990) Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Summa Phytopathologica*, **16**,13.
- Russel, M. (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: Type II protein secretion systems. *Journal of Molecular Biology*, **279**, 485-499.
- Sachdev, D. and Chirgwin, J.M. (1998) Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **244**, 933-937.
- Salmond, G.P.C. (1994) Secretion of Extracellular Virulence Factors by Plant- Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 181-200.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.,U.S.A.
- Scholten, M. and Tommassen, J. (1993) Topology of the PhoR Protein of *Escherichia-Coli* and Functional-Analysis of Internal Deletion Mutants. *Molecular Microbiology*, **8**, 269-275.
- Schweder, T., Lin, H.Y., Jurgen, B., Breitenstein, A., Riemschneider, S., Khalameyzer, V., Gupta, A., Buttner, K. and Neubauer, P. (2002) Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**, 330-337.
- Shi, L. and Hulett, F.M. (1999) The cytoplasmic kinase domain of PhoR is sufficient for the low phosphate-inducible expression of Pho regulon genes in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **31**, 211-222.
- Shimohata, N.; Chiba, S. Saikawa, N.; Ito, K. and Akyiama, Y. (2002) The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with a cytosolic active site. *Genes to Cells*, **7**: 653-662.

- Simpson, A.J.G., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L.M.C., Araya, J.E., Baia, G.S., Baptista, C.S., Barros, M.H., Bonaccorsi, E.D., Bordin, S., Bove, J.M., Briones, M.R.S., Bueno, M.R.P., Camargo, A.A., Camargo, L.E.A., Carraro, D.M., Carrer, H., Colauto, N.B., Colombo, C., Costa, F.F., Costa, M.C.R., Costa-Neto, C.M., Coutinho, L.L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A.P., Ferreira, A.J.S., Ferreira, V.C.A., 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.S., 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.C., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Lopes, S.A., Lopes, C.R., Machado, J.A., Machado, M.A., Madeira, A., Madeira, H.M.F., Marino, C.L., Marques, M.V., Martins, E.A.L., Martins, E.M.F., Matsukuma, A.Y., Menck, C.F.M., Miracca, E.C., Miyaki, C.Y., Monteiro-Vitorello, C.B., Moon, D.H., Nagai, M.A., Nascimento, A., Netto, L.E.S., Nhani, A., 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.G., Pereira, H.A., Pesquero, J.B., Quaggio, R.B., Roberto, P.G., Rodrigues, V., Rosa, A.J.D., de Rosa, V.E., de Sa, R.G., Santelli, R.V., Sawasaki, H.E., da Silva, A.C.R., da Silva, A.M., da Silva, F.R., Silva, W.A., da Silveira, J.F., *et al.* (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, **406**, 151-157.
- Soto, G.E. and Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*, **181**, 1059-1071.
- Tang, J.-L., Gough, C.L. and Daniels, M.J. (1990) Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular and General Genetics*, **222**, 157-160.
- Tubelis, A., Barros, J. C. and Leite, R. M. V. B. C. (1993). Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. *Laranja*, **14**, 239-254.
- Van Sluys, M.A., de Oliveira, M.C., Monteiro-Vitorello, C.B., Miyaki, C.Y., Furlan, L.R., Camargo, L.E.A., da Silva, A.C.R., Moon, D.H., Takita, M.A., Lemos, E.G.M., Machado, M.A., Ferro, M.I.T., da Silva, F.R., Goldman, M.H.S., Goldman, G.H.,

- Lemos, M.V.F., 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.C., 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., Sasaki, F.T., Sena, J.A.D., de Souza, A.A., Truffi, D., Tsukumo, F., Yanai, G.M., Zaros, L.G., Civerolo, E.L., Simpson, A.J.G., Almeida, N.F., Setubal, J.C. and Kitajima, J.P. (2003) Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology*, **185**, 1018-1026.
- Van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E.A., Menck, C.F.M., da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Oliveira, M.C., Setubal, J.C., Kitajima, J.P. and Simpson, A.J. (2002) Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 169-189.
- Vickerman, M.M., Mather, N.M., Minick, P.E. and Edwards, C.A. (2002) Initial characterization of the *Streptococcus gordonii* *htpX* gene. *Oral Microbiology and Immunology*, **17**, 22-31
- Wall, D. and Kaiser, D. (1999) Type IV *pili* and cell motility. *Molecular Microbiology*, **32**, 1-10.
- Weiner, L. and Model, P. (1994) Role of an *Escherichia-Coli* Stress-Response Operon in Stationary-Phase Survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 2191-2195
- Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.Y., Weisburg, W.G., Mandelcopaul, L. and Brenner, D.J. (1987) *Xylella-Fastidiosa* Gen-Nov, Sp-Nov - Gram-Negative, Xylem- Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas-Spp*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**, 136-143.
- Willsky, G.R., Bennett, R.L. and Malamy, M.H. (1973) Inorganic-Phosphate Transport in *Escherichia-Coli* - Involvement of 2 Genes Which Play a Role in Alkaline-Phosphatase Regulation. *Journal of Bacteriology*, **113**, 529-539.

- Willsky, G.R. and Malamy, M.H. (1976) Control of Synthesis of Alkaline-Phosphatase and Phosphate- Binding Protein in *Escherichia-Coli*. *Journal of Bacteriology*, **127**, 595-609.
- Winther-Larsen, H.C. and Koomey, M. (2002) Transcriptional, chemosensory and cell-contact-dependent regulation of type IV pilus expression. *Current Opinion in Microbiology*, **5**, 173-178
- Wu, S.S. and Kaiser, D. (1997) Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, **179**, 7748-7758
- Yamada, M., Makino, K., Amemura, M., Shinagawa, H. and Nakata, A. (1989) Regulation of the Phosphate Regulon of *Escherichia-Coli* - Analysis of Mutant PhoB and PhoR Genes Causing Different Phenotypes. *Journal of Bacteriology*, **171**, 5601-5606.
- Yasukawa, T., Kaneiishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. and Ishii, S. (1995) Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia-Coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 25328-25331

ANEXO I

Tabela I. Sequências dos *primers* utilizados.

<i>Primer</i>	Sequência	Temp. anelamento
<i>Primers série TR</i>		
1524F	5' GAGCAAACAGATGGGCAGTG 3'	58°C
1524R	5' GTGCCAACCAACGATCAGAG 3'	58°C
2592F	5'CTTGGAACAGTGAGGCCACAG 3'	58°C
2592R	5'GCGTAGAACGTTGGAGCCATAC 3'	58°C
2625F	5'CGCTAAACATGGCTAATAAC 3'	52°C
2625R	5'TTATCGCTTGATATTCAGTG 3'	52°C
1517F	5'TTTCTACCTTCAGGTGCGATTC 3'	57°C
1517R	5'TATCCCTCAACGTCCATTGG 3'	57°C
2546F	5'CCATAGGGTTGCAATCTGC 3'	56°C
2546R	5'AAGGATTTGGCGGCTGTG 3'	56°C
<i>Primers série PR</i>		
1524petD	5'GGTATTGAGGGTTCGCTTGGGAAGAGGG 3'	60°C
1524petR	5'AGAGGAGAGTTAGAGCCTTAACGTTGTGCC 3'	60°C
2592petD	5'GGTATTGAGGGTTCGCGTGAGTATTGTC 3'	60°C
2592petR	5'AGAGGAGAGTTAGAGCCTCAAGGCCGGTATC 3'	60°C
2625petD	5'GGTATTGAGGGTTCGCATGTTGACTCGTATTG 3'	60°C
2625petR	5'AGAGGAGAGTTAGAGCCTTATTGTCTAGCC 3'	60°C
1517petD	5'GGTATTGAGGGTTCGCGTGGAAAATAGG 3'	60°C
1517petR	5'AGAGGAGAGTTAGAGCCTCAGCCTTCCTCCGTC3'	60°C
2546petD	5'GGTATTGAGGGTTCGCTTGCCTGGTATTCG 3'	60°C
2546petR	5'AGAGGAGAGTTAGAGCCTCACTTCGGAAT 3'	60°C
<i>Primers regulon pho</i>		
2145D	5' ATGAACACCTCGTACAACACTACCA 3'	63°C
2145R	5' TCAATCTAGGTTTACGTTGCTG 3'	62°C
0657D	5' ATGCGTTTCTCAATTTATCG 3'	60°C
0657R	5' TCACTCCCTCCTCTGGCC 3'	63°C
0390D	5' ATGCTAATGGGGAAACGG 3'	62°C
0390R	5' TTATAACCCTGGAGGCAATAC 3'	61°C
0389D	5'ATGCGTATCCTTTTGGTTCG 3'	62°C
0389R	5' TTAATTTTCGTTGCGGGC 3'	63°C
2593D	5'GTGATCCGGATTTGG 3'	50°C
2593R	5'TCAGATCTGGATCGCC 3'	53°C
TRX32D	5'GTGCACTGTCTAAAGGTCAG 3'	55°C