

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

**PAULO ADRIANO ZAINI**

**O estímulo de ferro em *Xylella fastidiosa***

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

15/08/2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULO ADRIANO ZAINI

**O estímulo de ferro em *Xylella fastidiosa***

Tese apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para obtenção  
do Título de Doutor em Ciências, área Bioquímica

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aline Maria da Silva

São Paulo  
2007

Paulo Adriano Zaini

**O estímulo de ferro em *Xylella fastidiosa***

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

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

dedico este trabalho aos meus pais, Pedro e Terezinha,  
à Profa. Aline Maria da Silva e a todos os cientistas que me antecederam.

"We would like to think ourselves  
necessary, inevitable, ordained for  
all eternity.  
All religions, all philosophies, and  
even part of science testify  
to the unwearying, heroic effort  
of mankind  
desperately denying  
its own contingency"

Jacques Monod, *Chance and Necessity*, 1971

## AGRADECIMENTOS

- À Aline Maria da Silva pela orientação e ensinamentos desde 1998.
- Aos meus pais Pedro e Terezinha Zaini pelo carinho e pelos bons exemplos.
- Aos amigos e mestres Helder Nakaya e Ricardo Vêncio pela ajuda e ensinamentos neste trabalho.
- À Fernanda Lupo pela ajuda.
- À Tie Koide pelo exemplo de cientista e pela ajuda.
- À Adriana Matsukuma e Denise Yamamoto por toda a ajuda e dedicação no laboratório de microarranjos (CAGE Lab).
- Ao pessoal do lab; Alexandre Sanchez, Daniela Gonzalez Kristeller, Ana Simões, Andréa Fogaça, Patrícia Pessoa, Layla Martins, Renato Raposo, Marivon Pereira e os membros antigos, Luiz Paulo, Leonardo, Pio, Daniela, Fabiana, Juliana, Evelyn, Leandro e Paulo, pela convivência, participação, ensinamentos e por sempre estarem dispostos a me ajudar.
- Ao Milton Yutaka e Thiago Venâncio pelos socorros bioinformáticos.
- Aos Professores Sérgio Verjovski-Almeida e Suely Lopes Gomes pelos ensinamentos e por disponibilizarem seus laboratórios.
- Aos PDBs, em especial ao irmão Lucas Blanes e todos outros amigos que me ajudam a enxergar a vida fora do lab.
- Aos professores Bayardo Torres, Pio Colepico e Shaker Chuck Farah pelos exemplos.
- A toda comunidade do IQ-USP por construir um espaço agradável para se trabalhar.
- À Universidade de São Paulo pela oportunidade de ingressar no mundo científico.
- À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1. Características do fitopatógeno <i>Xylella fastidiosa</i> .....	11
1.2. A tecnologia de microarranjos de DNA para análise da expressão gênica global em bactérias .....	17
1.2. A tecnologia de microarranjos de DNA para análise da expressão gênica global em bactérias .....	18
1.3. O ferro e sua relação com patogenicidade e virulência de bactérias .....	21
1.3.1. Características da sequência <i>Fur box</i> .....	24
1.3.2. O metabolismo de ferro em <i>X. fastidiosa</i> .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>30</b>
3.1. Cultivo de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	30
3.2. Extração de DNA genômico de <i>X. fastidiosa</i> .....	30
3.3. Extração de RNA total de <i>X. fastidiosa</i> .....	31
3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	32
3.5. Eletroforese de DNA e RNA em gel de agarose .....	33
3.6. Análise de expressão gênica com microarranjos de DNA .....	33
3.6.1. Amplificação e purificação dos fragmentos CDS-específicos por PCR .....	34
3.6.2. Confeção dos microarranjos de DNA de <i>X. fastidiosa</i> .....	35
3.6.3. Preparação de cDNA marcado e hibridização com os microarranjos .....	35
3.6.4. Detecção, quantificação e normalização dos sinais de fluorescência .....	36
3.6.5. Determinação dos intervalos de credibilidade para as razões dos sinais .....	37
3.6.6. Classificação das CDS .....	37
3.7. PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) .....	38
3.8. Obtenção e purificação da proteína recombinante Xf-Fur .....	40
3.8.1. Clonagem da sequência codificadora de <i>Fur</i> de <i>X. fastidiosa</i> .....	40
3.8.2. Expressão da proteína recombinante Xf-Fur .....	40
3.8.3. Purificação de Xf-Fur recombinante por cromatografia de afinidade .....	41
3.8.4. Digestão da proteína recombinante com enteroquinase .....	41
3.8.5. Detecção imunológica de Xf-Fur recombinante .....	42
3.9. Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA) .....	42
3.9.1 Obtenção dos fragmentos de regiões promotoras contendo <i>Fur boxes</i> de <i>X. fastidiosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	42

3.9.2. Marcação dos fragmentos de DNA com [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP e purificação.....	43
3.9.3. Ensaio de interação DNA-proteína.....	43
3.10. Análise e comparação de sequências de DNA e proteínas.....	44
3.10.1. Busca <i>in silico</i> por Fur boxes de <i>X. fastidiosa</i> .....	44
3.11. Outros procedimentos .....	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
4.1. Construção do microarranjo representativo do genoma de <i>X. fastidiosa</i> 9a5c .....	45
4.2. Análise do transcrito de <i>X. fastidiosa</i> submetida ao cultivo <i>in vitro</i> em excesso e carência de ferro .....	47
4.2. Análise do transcrito de <i>X. fastidiosa</i> submetida ao cultivo <i>in vitro</i> em excesso e carência de ferro .....	48
4.2.1. Excesso de ferro.....	48
4.2.2. Carência de ferro .....	54
4.2.3. Validação da expressão diferencial através de RT-qPCR .....	61
4.3. Identificação de Fur boxes e caracterização funcional da proteína Fur de <i>X. fastidiosa</i> .....	64
4.3. Identificação de Fur boxes e caracterização funcional da proteína Fur de <i>X. fastidiosa</i> .....	65
4.3.1. Busca <i>in silico</i> de sequências Fur box no genoma de <i>X. fastidiosa</i> .....	65
4.3.2. Obtenção de Xf-Fur recombinante .....	67
4.3.3. Análise da interação Xf-Fur com Fur boxes através de EMSA.....	70
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>88</b>
<b>8. ANEXO – Súmula Curricular .....</b>	<b>101</b>



## RESUMO

Zaini, P.A. **O stimulon de ferro em *Xylella fastidiosa***. 2007. 101p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

*Xylella fastidiosa* é o agente etiológico de diversas doenças em plantas, incluindo a Clorose Variegada dos Citros (CVC), uma séria ameaça à indústria citrícola. Os níveis de transcritos sob diferentes disponibilidades de ferro foram medidos com microarranjos de DNA representando 2608 (91,6%) sequências codificadoras (CDS) da cepa 9a5c de *X. fastidiosa*. Na presença de 100 µM pirofosfato férrico, 218 e 256 CDS foram consideradas como reguladas positiva e negativamente, respectivamente. Quando tratada com o quelante de ferro 2,2'-dipiridil, 193 CDS foram consideradas como reguladas positivamente e 216 negativamente. A expressão diferencial de um subconjunto de 44 CDS foi também avaliada por RT-qPCR, que mostrou uma correlação de Pearson de 0,77 com os resultados dos microarranjos. As CDS diferencialmente expressas nas variações de concentração de ferro participam em diversas funções celulares. Muitas CDS envolvidas com funções regulatórias, patogenicidade e estrutura celular foram moduladas em ambas as condições testadas, sugerindo que grandes mudanças na arquitetura celular e metabolismo ocorrem quando células de *X. fastidiosa* são expostas a variações extremas na concentração de ferro. Interessantemente, as CDS moduladas incluem as de síntese e secreção de bacteriocinas similares à colicina tipo V e funções ligadas a formação de pilus e fimbria.

Nós também investigamos a contribuição do regulador transcricional Fur no stimulon do ferro em *X. fastidiosa*. Para tal, as regiões promotoras do genoma da cepa 9a5c foram varridas em busca de Fur *boxes* putativas. Nossas análises identificaram que regiões promotoras de 49 CDS contêm elementos com características de Fur *boxes*. A funcionalidade de pelo menos uma das Fur *boxes* identificadas foi confirmada através de ensaios de alteração de mobilidade eletroforética que demonstraram sua interação específica com a proteína recombinante Fur de *X. fastidiosa*. Entretanto, nem todos os genes cuja expressão é modulada por alterações na concentração de ferro, são diretamente regulados por Fur, apoiando a hipótese de que Fur não é o único responsável pela modulação do stimulon de ferro em *X. fastidiosa*. Em conjunto, nossos dados apresentam novas evidências da relação entre a disponibilidade de ferro e a regulação de determinantes de patogenicidade e virulência em *X. fastidiosa*.

**Palavras chave:** *Xylella fastidiosa*, patogenicidade, ferro, microarranjo, colicina, pilus.

## ABSTRACT

Zaini, P.A. **The iron stimulon of *Xylella fastidiosa***. 2007. 101p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

*Xylella fastidiosa* is the etiologic agent of a wide range of plant diseases including citrus variegated chlorosis (CVC), a major threat to citrus industry. Transcript levels in different iron availabilities were assessed with DNA microarrays representing 2608 (91.6%) coding sequences (CDS) of *X. fastidiosa* CVC strain 9a5c. In the presence of 100  $\mu$ M of ferric pyrophosphate, 218 and 256 CDS were considered as up- and down-regulated, respectively. When treated with the iron chelator 2,2'-dipyridyl, 193 CDS were considered as up-regulated and 216 as down-regulated. Differential expression for a subset of 44 CDS was further evaluated by RT-qPCR that showed a Pearson correlation of 0.77 with array results. The CDS differentially expressed upon the iron concentration shift participate in diverse cellular functions. Many CDS involved with regulatory functions, pathogenicity and cell structure, were modulated in both conditions tested suggesting that major changes in cell architecture and metabolism occur when *X. fastidiosa* cells are exposed to extreme variations in iron concentration. Interestingly, the modulated CDS include those related to colicin V-like bacteriocin synthesis and secretion and to pili/fimbriae functions.

We also investigated the contribution of the ferric uptake regulator Fur to the iron stimulon of *X. fastidiosa*. Thus, the promoter regions of strain 9a5c genome were screened for putative Fur boxes. Our analyses identified Fur boxes-like elements in promoter regions of 49 CDS. The functionality of at least one Fur box was confirmed by electrophoretic mobility shift assays which demonstrated its interaction with *X. fastidiosa* recombinant Fur. However, not all genes that appeared to be modulated by iron concentration shift are directly regulated by Fur. This supports the hypothesis that Fur is not solely responsible for the modulation of the iron stimulon of *X. fastidiosa*. Taken together, our data present novel evidence for iron regulation of pathogenicity and virulence determinants in *X. fastidiosa*.

**Keywords:** *Xylella fastidiosa*, pathogenicity, iron, microarray, colicin, pilus.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: adenosina trifosfato	mJ: milijoule
BLAST: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfônico
BSA: albumina de soro bovino	mRNA: ácido ribonucléico mensageiro
cDNA: DNA complementar	MTM Dens : densidade de fluorescência média removida de artefatos
CDS: sequência codificadora	pb: pares de base
COG: <i>Cluster of Orthologous Groups</i>	PCR: reação em cadeia da polimerase
CVC: Clorose Variegada dos Citros	PD: Doença de Pierce
DEPC: dietilpirocarbonato	PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila
DMSO: dimetil sulfóxido	qPCR: PCR quantitativa
DNA: ácido desoxirribonucléico	RNA: ácido ribonucléico
DNase: desoxirribonuclease	RNase: Ribonuclease A
dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato	rpm: rotações por minuto
DO: densidade óptica	RT: transcrição reversa
DTT: ditioneitol	RT-qPCR: qPCR precedida por RT
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético	SDS: dodecil sulfato de sódio
EMSA: ensaio de alteração de mobilidade eletroforética	SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
EST: <i>Expressed Sequence Tag</i>	SSC: tampão citrato de sódio
g: unidades de gravidade	TBS: Tampão 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 150 mM NaCl
Fur: <i>ferric uptake regulator</i>	TE: Tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 contendo 1 mM EDTA
GEO: <i>Gene Expression Omnibus</i>	Tm: temperatura de fusão
IPTG: isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano
kb: quilobase	U: unidade de atividade enzimática
kDa: quilo Dalton	UV: ultravioleta
M: molar	V: volt
mA: miliampére	
MAD: desvio absoluto da mediana	
MES: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico	

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Características da infecção por *Xylella fastidiosa*. (pág. 15)
- Figura 2:** Mapa genômico da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* indicando a posição das CDS..... (pág. 16)
- Figura 3:** Modelo para interação entre Fur e RyhB .... (pág. 25)
- Figura 4:** Interpretações de Fur box. (pág. 25)
- Figura 5:** Comparação da sequência de aminoácidos de Fur de *X. fastidiosa* com ortólogos de outras bactérias (pág. 27)
- Figura 6:** Metabolismo de ferro em *Xylella fastidiosa*. (pág. 28)
- Figura 7:** Obtenção dos produtos de PCR para construção dos microarranjos de DNA de *Xylella fastidiosa*. (pág. 46)
- Figura 8:** Construção do microarranjo versão 2 de *Xylella fastidiosa*. (pág. 47)
- Figura 9:** Agrupamento por *K-means clustering* de CDS diferencialmente expressas em células de *X. fastidiosa* submetidas a excesso de ferro. (pág. 51)
- Figura 10:** Validação por RT-qPCR de perfis de expressão ..... (pág. 52)
- Figura 11:** Categorias funcionais das CDS diferencialmente expressas em excesso de ferro. (pág. 52)
- Figura 12:** Agrupamento por *K-means clustering* de CDS diferencialmente expressas em células de *X. fastidiosa* submetidas à carência de ferro. (pág. 57)
- Figura 13:** Validação por RT-qPCR de perfis de expressão ..... (pág. 58)
- Figura 14:** Categorias funcionais das CDS diferencialmente expressas em carência de ferro.(pág. 58)
- Figura 15:** Correlação geral entre dados de microarranjo e RT-qPCR. (pág. 64)
- Figura 16:** Clonagem da sequência codificadora de *fur* de *X. fastidiosa* .... (pág. 69)
- Figura 17:** Purificação de XF-Fur recombinante por cromatografia de afinidade. (pág. 70)
- Figura 18:** Ensaios de interação de Xf-Fur recombinante com Fur boxes. (pág. 72)
- Figura 19:** *Fur box* consenso de *Xylella*. (pág. 72)
- 
- Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-qPCR. (pág. 39)
- Tabela 2:** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de EMSA. (pág. 43)
- Tabela 3:** Resumo das hibridizações aos microarranjos sob excesso de ferro. (pág. 47)
- Tabela 4:** Resumo das hibridizações aos microarranjos sob carência de ferro. (pág. 54)
- Tabela 5:** Níveis de transcritos de CDS selecionadas analisados por RT-qPCR. (pág. 63)
- Tabela 6:** Fur boxes putativas de *X. fastidiosa* utilizadas para obter o consenso. (pág. 66)
- 
- Tabela S1:** Lista das 112 Fur boxes caracterizadas em outras bactérias. (pág. 89)
- Tabela S2:** CDS reguladas positivamente sob excesso de ferro. (pág. 91)
- Tabela S3:** CDS reguladas negativamente sob excesso de ferro. (pág. 93)
- Tabela S4:** CDS reguladas positivamente sob carência de ferro. (pág. 95)
- Tabela S5:** CDS reguladas negativamente sob carência de ferro. (pág. 97)
- Tabela S6:** CDS previamente hipotéticas que foram reanotadas neste trabalho. (pág. 99)

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Características do fitopatógeno *Xylella fastidiosa*

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa, não flagelada, restrita ao xilema e como seu nome sugere, apresenta crescimento muito lento. Esta espécie bacteriana é responsável por doenças em uma ampla variedade de plantas economicamente importantes tais como laranjeiras, videiras, amendoeiras e cafeeiros. A bactéria é transmitida de planta a planta através de insetos que se alimentam de seiva bruta (Purcell e Hopkins 1996; Purcell et al. 1999; Redak et al. 2004).

Nas videiras, *X. fastidiosa* causa a doença de Pierce (PD), que tem como sintomas principais a necrose periférica nas folhas, abscisão e queimadura foliar, e declínio do vigor levando a planta à morte. Este conjunto de sintomas sugere uma disfunção do sistema de condução de água (Hopkins 1989). A doença de Pierce está presente no estado da Califórnia, nos Estados Unidos, desde 1884 e ocorre também em videiras de outros estados do sul dos EUA, como a Flórida e Texas, além do México e países da América Central. A partir de 1990, a doença agravou-se em razão do aumento de uma espécie de cigarrinhas oriunda do extremo sul dos EUA e do México. Em 1999, mais de 300 acres de videiras da região de Temecula na Califórnia foram destruídos pela PD (Hopkins e Purcell 2002). Segundo dados do Programa de Controle da Doença de Pierce da Califórnia, esta doença ameaça negócios diretamente derivados da vinicultura estimados em mais de 33 bilhões de dólares (<http://www.cdfa.ca.gov/gwss/>).

Os sintomas da Clorose Variegada dos Citros (CVC), doença causada por *X. fastidiosa* nas laranjeiras, incluem clorose intervenal, semelhante àquela decorrente da deficiência de zinco, tamanho reduzido de folhas e frutos e lesões com presença de goma na face abaxial das folhas, que eventualmente podem sofrer necrose (Figura 1). A CVC foi identificada no Brasil em 1987 e hoje afeta em torno de 40% das plantas no Estado de São Paulo e parte do triângulo mineiro (<http://www.fundecitrus.com.br/>), causando prejuízos anuais da ordem de 100 milhões de dólares à agroindústria brasileira (Rossetti et al. 1990; Neves et al. 2001). As principais variedades comerciais de laranja doce são suscetíveis à infecção por *X. fastidiosa* (Hopkins 1989; Chang et al. 1993; Li et al. 1999)(<http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/>).

As plantas infectadas por *X. fastidiosa* apresentam os vasos do xilema bloqueados por agregados celulares bacterianos (Figura 1), adensados pela presença da goma (Mollenhauer e Hopkins 1974, 1976). Entretanto, não há consenso se a bactéria causa oclusões suficientes no xilema para produzir estresse hídrico. Por esta razão, mecanismos de patogenicidade alternativos foram sugeridos como, por exemplo, a produção, pela

bactéria, de uma fitotoxina que seria responsável pelos sintomas de queimadura nas folhas (Mircetich *et al.* 1976). Além disso, a produção de um metabólito que interferiria com fitorreguladores foi sugerida como mecanismo para doença “phony” do pessegueiro (French *et al.* 1978).

Na CVC, os principais sintomas parecem estar relacionados ao estresse hídrico e/ou nutricional, embora outros fatores que aumentem a virulência da infecção por *X. fastidiosa* não possam ser excluídos. Prováveis mecanismos de patogenicidade foram sugeridos a partir da análise do repertório de genes anotados no genoma completamente sequenciado da cepa 9a5c (Dow e Daniels 2000; Lambais *et al.* 2000; Simpson *et al.* 2000; Marques *et al.* 2001). Esta cepa foi isolada de laranjeiras sintomáticas no município de Macaúbal, SP e tendo sido posteriormente confirmada a sua capacidade em produzir sintomas típicos de CVC em *Citrus sinensis*, *Nicotiana tabacum* e *Catharantus roseus* (Li *et al.* 1999; Monteiro *et al.* 2001; Koide *et al.* 2004).

O genoma de outras cepas de *X. fastidiosa* foram posteriormente elucidados (Bhattacharyya *et al.* 2002a; Van Sluys *et al.* 2003) possibilitando estudos comparativos *in silico* intra-espécie e também com outros fitopatógenos, cuja sequência genômica já está determinada. Estas análises têm sido utilizadas na identificação de CDS (sequências codificadoras) possivelmente relacionadas aos mecanismos de adaptação, patogenicidade e virulência em *X. fastidiosa* (Bhattacharyya *et al.* 2002a; Bhattacharyya *et al.* 2002b; da Silva *et al.* 2002; Van Sluys *et al.* 2003; Moreira *et al.* 2005; Qian *et al.* 2005; Setubal *et al.* 2005; Studholme *et al.* 2005; Binnewies *et al.* 2006; Doddapaneni *et al.* 2006). Outras abordagens, tais como comparação de genomas através de microarranjos de DNA, também têm contribuído para revelar variações na composição gênica entre cepas ou isolados de *X. fastidiosa* (Costa de Oliveira *et al.* 2002; Nunes *et al.* 2003; Koide *et al.* 2004). A estes estudos somam-se análises do transcrito de *X. fastidiosa* que evidenciam algumas CDS como potenciais determinantes de patogenicidade e virulência (de Souza *et al.* 2003; Koide *et al.* 2004; de Souza *et al.* 2005; Pashalidis *et al.* 2005; Koide *et al.* 2006; da Silva Neto *et al.* 2007).

Embora *X. fastidiosa* seja a Gamma-Proteobacteria fitopatogênica com o menor genoma já sequenciado (Preston 2007), neste foram identificados dezenas de genes que codificam para proteínas potencialmente relacionadas à patogenicidade e sobrevivência no hospedeiro (Bhattacharyya *et al.* 2002b; Van Sluys *et al.* 2003). Um fato interessante é que este genoma possui seu arsenal espalhado por todo o cromossomo principal (Figura 2) e não possui ilhas de patogenicidade ou plasmídeos de virulência, comumente encontrados em outros gêneros de bactérias patogênicas (Van Sluys *et al.* 2002; Mulvey *et al.* 2006; Preston 2007). O repertório de genes de *X. fastidiosa* inclui, por exemplo, o operon de biossíntese do polissacarídeo extracelular (EPS) e genes relacionados à biogênese de pilus

tipo-IV (*pilABCDEFGHIJLL1MNOPQRSTUVWXYZ*) e fimbrias (*fimAD ecpD*), os quais estão localizados em pequenos operons em posições distintas do genoma de qualquer uma das cepas já sequenciadas. Estas estruturas juntamente com o EPS parecem contribuir para a formação dos agregados de bactéria e na sua adesão na parede dos vasos do xilema (Hopkins 1989; Simpson *et al.* 2000; da Silva *et al.* 2001; Souza *et al.* 2006). Dados obtidos a partir da análise fenotípica de mutantes de *X. fastidiosa* cepa Temecula (Xf-PD) mostraram que as fimbrias (pilus tipo-I) são importantes para a adesão das células e para formação do biofilme (Meng *et al.* 2005; Li *et al.* 2007). Além disso, já foi mostrado que a produção de EPS parece também contribuir para a fitopatogenicidade de *X. fastidiosa* como também verificado em outros fitopatogenos como *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia amylovora* e *Ralstonia solanacearum* (Denny 1995; Katzen *et al.* 1998; da Silva *et al.* 2001; Malnoy *et al.* 2005; Chang *et al.* 2007; Shinohara *et al.* 2007). Por outro lado, análises dos fenótipos de mutantes de Xf-PD deficientes na formação de pilus tipo-IV (pilus longo) indicaram que estas estruturas além de contribuïrem na formação de biofilme, são essenciais para a mobilidade das células, sendo determinantes para eficiente colonização do hospedeiro (Li *et al.* 2007).

O genoma das quatro cepas de *X. fastidiosa* inclui genes que codificam para adesinas e proteínas similares a hemaglutininas, que provavelmente também estão relacionados a mecanismos de adesão da bactéria aos seus hospedeiros. Vale ressaltar que o mutante de Xf-PD com o gene que codifica uma proteína similar a hemaglutinina nocauteado exibiu um fenótipo mais virulento, visto que apresentou uma maior capacidade de colonizar a planta (videira) (Simpson *et al.* 2000; Bhattacharyya *et al.* 2002b; Van Sluys *et al.* 2003; Guilhabert e Kirkpatrick 2005).

Além disso, *X. fastidiosa* aparentemente também produz várias toxinas (hemolisinas, toxinas do tipo RTX e colicina do tipo V) as quais também podem estar relacionadas a sua virulência. Seu genoma também codifica para enzimas que estariam envolvidas na degradação de parede celular da planta, possibilitando a migração da bactéria entre os vasos do xilema ou, alternativamente, gerando carboidratos para sua nutrição e crescimento (Simpson *et al.* 2000; Bhattacharyya *et al.* 2002a; Van Sluys *et al.* 2003; Pashalidis *et al.* 2005; Wulff *et al.* 2006; Reddy *et al.* 2007; Roper *et al.* 2007).

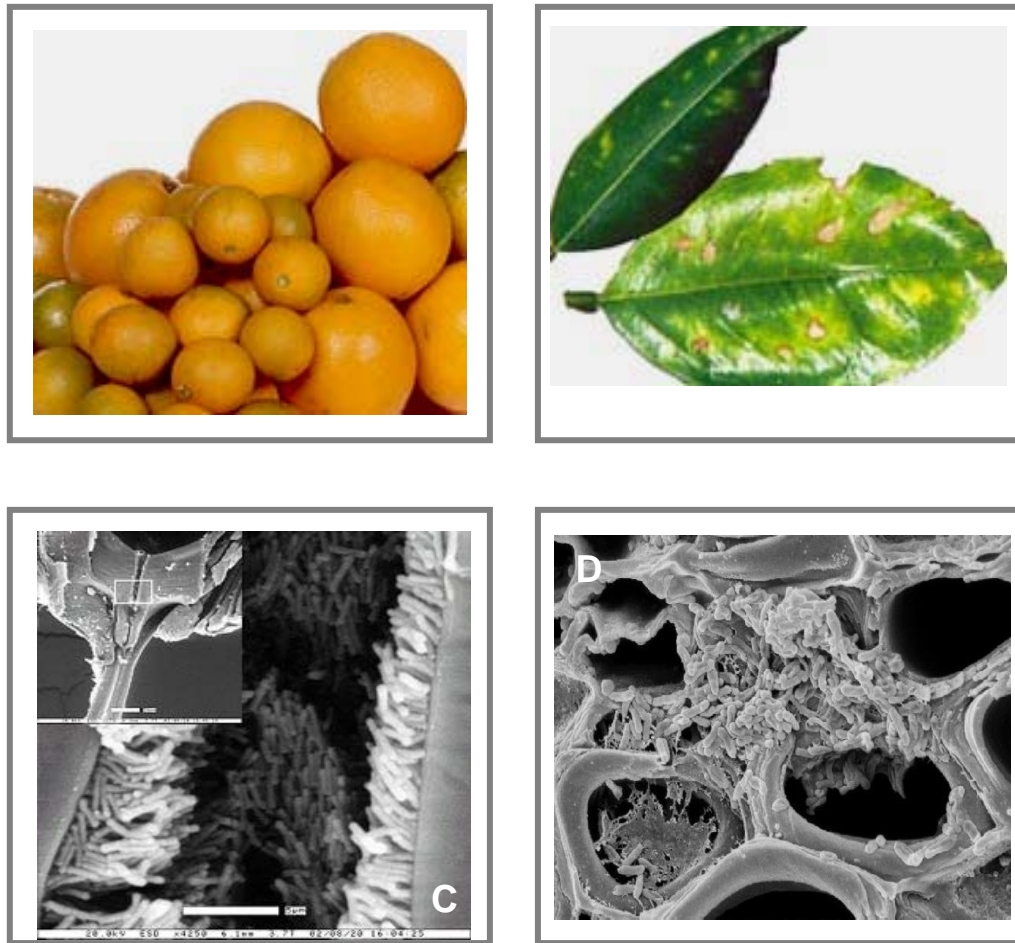
Entretanto, apesar de seu amplo arsenal de genes potencialmente relacionados a patogenicidade e virulência, *X. fastidiosa* não dispõe do sistema secretório tipo III, comumente empregado por fitopatógenos para transferir proteínas efetoras ao hospedeiro para suprimir sua resposta defensiva (Simpson *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2004; Grant *et al.* 2006; Tang *et al.* 2006). Esta bactéria também não exibe em seu genoma principal componentes para o sistema de transferência de DNA similar a *Agrobacterium tumefaciens* (sistema secretório tipo IV), ainda que o plasmídeo pXF51 codifique os genes para formação

de pilus conjugativo (Marques *et al.* 2001). Por outro lado, todos os componentes dos sistemas secretórios do tipo I e II, responsáveis pela secreção de diversos tipos de proteínas como toxinas, proteases e outras enzimas catabólicas, estão codificados no genoma de *X. fastidiosa* (Simpson *et al.* 2000; Reddy *et al.* 2007).

Como será discutido adiante, genes regulados por ferro são frequentemente associados à patogenicidade e virulência tanto em patógenos de animais como em fitopatógenos. Pelo menos 67 genes relacionados ao metabolismo de ferro foram anotados no genoma de *X. fastidiosa*. Entre estes genes estão receptores para captação de ferro e reguladores da expressão de genes responsivos ao ferro. Foi proposto que a tomada de ferro e, talvez, de outros metais de transição pela bactéria, deplete o xilema destes micronutrientes contribuindo para a clorose típica das folhas que é observada na maioria das doenças causadas por *X. fastidiosa* (Simpson *et al.* 2000; Hopkins e Purcell 2002; Thorne *et al.* 2006).

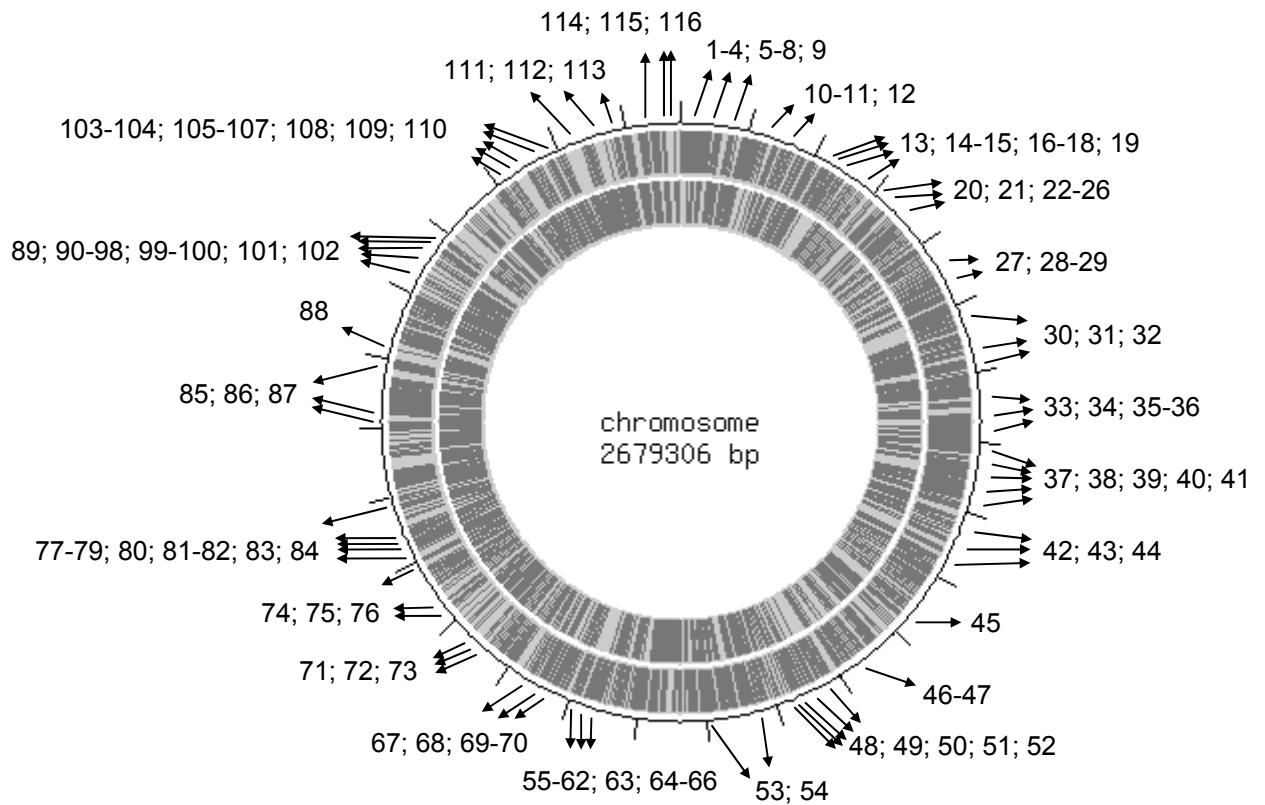
Como já mencionado, a informação gerada com o sequenciamento completo do genoma das diferentes cepas *X. fastidiosa*, tem possibilitado a investigação de seus potenciais mecanismos de patogenicidade através de diversas abordagens tanto em escala genômica como gene a gene. Entre as estratégias de genômica funcional, seu perfil de expressão gênica global tem sido detalhadamente investigado, utilizando-se a técnica de microarranjos de DNA. Essa técnica vem sendo amplamente utilizada na última década para o estudo da expressão de gênica em eucariotos e procariotos, permitindo uma comparação refinada do transcrito de um organismo frente a diferentes tratamentos e condições de cultivo e também entre seus diferentes tipos ou linhagens celulares.





**Figura 1. Características da infecção por *Xylella fastidiosa*.** (A) Frutos saudáveis ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à CVC. (B) Estágio mais avançado dos sintomas nas folhas, com lesões de cor palha. (C) Células de *X. fastidiosa* Temecula-1 aderidas ao trato digestivo de inseto vetor da subfamília Cicadellinae. (D) Células de *X. fastidiosa* 9a5c crescem e se multiplicam no interior dos vasos do xilema de *Citrus sinensis*, bloqueando o transporte de seiva bruta. Imagens retiradas de <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc.html> (A e B), <http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/> (C) e <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/> (D).

A



**Figura 2. Mapa genômico da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* indicando a posição das CDS potencialmente relacionadas com patogenicidade e sobrevivência no hospedeiro. (A)** A figura mostra as duas fitas do DNA circular, com as linhas em cinza representando os genes (CDS). O genoma foi dividido em seções de 100.000 pb e as setas indicam as CDS ou grupos de CDS destacadas com números e listadas na tabela mostrada em **B**, próxima página. Mapa modificado a partir do mapa equivalente para *X. fastidiosa* cepa Temecula 1 disponível no sítio do DNA Data Bank of Japan (<http://gib.genes.nig.ac.jp/>).

## B

#	CDS	gene	Cat. Func.	#	CDS	gene	Cat. Func.	#	CDS	gene	Cat. Func.
1	XF0009	tonB	6	40	XF0810	engXCA	2	79	XF1900	tolQ	6
2	XF0010	exbB	6	41	XF0818	engXCA	2	80	XF1948	cvpA	9
3	XF0011	exbD1	6	42	XF0858	surE	1	81	XF1952	pilL	8
4	XF0012	exbD2	6	43	XF0889	pspA	7	82	XF1953	pilJ	8
5	XF0029	pilV	8	44	XF0933	feoB	6	83	XF1955	pilG	8
6	XF0031	pilX	8	45	XF1011	frpC	9	84	XF1987	vacB	5
7	XF0032	pilY1	8	46	XF1114	rpfC	3	85	XF2134	bfeA	6
8	XF0033	pilE	8	47	XF1115	rpfF	3	86	XF2137	bfeA	6
9	XF0080	pilA	8	48	XF1172	secY	2	87	XF2196	pspA	7
10	XF0132	copA	1	49	XF1210	gst	1	88	XF2232	cpeB	1
11	XF0133	copB	1	50	XF1216	cvaA	9	89	XF2344	fur	6
12	XF0175	hly	9	51	XF1220	cvaB	9	90	XF2360	gumM	4
13	XF0223	vacC	5	52	XF1224	pilY1	8	91	XF2361	gumK	4
14	XF0225	secD	2	53	XF1267	cbhA	2	92	XF2362	gumJ	4
15	XF0226	secF	2	54	XF1341	cutC	1	93	XF2364	gumH	4
16	XF0262	cvaC	9	55	XF1516	uspA1	7	94	XF2365	gumF	4
17	XF0263	cvaC	9	56	XF1517	xpsE	2	95	XF2366	gumE	4
18	XF0264	cvaC	9	57	XF1518	xpsF	2	96	XF2367	gumD	4
19	XF0287	rpfB	3	58	XF1519	xpsG	2	97	XF2369	gumC	4
20	XF0290	rpfA	3	59	XF1520	xpsH	2	98	XF2370	gumB	4
21	XF0304	secG	2	60	XF1521	xpsI	2	99	XF2397	hlyB	9
22	XF0369	pilM	8	61	XF1522	xpsJ	2	100	XF2398	hlyD	9
23	XF0370	pilN	8	62	XF1527	xpsD	2	101	XF2407	frpC	9
24	XF0371	pilO	8	63	XF1529	hsf	7	102	XF2416	lytB	1
25	XF0372	pilP	8	64	XF1530	ahpC	1	103	XF2537	pilD	8
26	XF0373	pilQ	8	65	XF1531	ahpF	1	104	XF2538	pilC	8
27	XF0450	pilH	8	66	XF1532	oxyR	1	105	XF2544	pilB	8
28	XF0478	pilY1	8	67	XF1621	pbp	1	106	XF2545	pilR	8
29	XF0479	pilE	8	68	XF1623	mdoH	1	107	XF2546	pilS	8
30	XF0506	vapE	5	69	XF1632	pilU	8	108	XF2550	hecB	9
31	XF0599	ybiL	6	70	XF1633	pilT	8	109	XF2586	tolC	1
32	XF0619	cutA	1	71	XF1726	linC	1	110	XF2614	sodA	1
33	XF0668	frpC	9	72	XF1729	padA	1	111	XF2639	secE	2
34	XF0677	pilZ	8	73	XF1732	ncr	1	112	XF2682	mdoG	1
35	XF0720	higB	5	74	XF1801	secB	2	113	XF2708	egl	2
36	XF0721	higA	5	75	XF1827	ohr	1	114	XF2759	frpC	9
37	XF0749	xrfA	5	76	XF1890	gpo	1	115	XF2775	pspA	7
38	XF0754	acvB	5	77	XF1898	tolA	6	116	XF2778	thdF	1
39	XF0767	hlyU	9	78	XF1899	tolR	6	117	XFa0052	vapD	5

**Figura 2 (continuação):** (B) Lista dos genes segundo a numeração (#) indicada no mapa mostrado na Figura 2A. As categorias funcionais (Cat. Func.) utilizadas foram: 1) desintoxicação e adaptação; 2) degradação da parede celular vegetal; 3) regulação de fatores de patogenicidade; 4) síntese e secreção de EPS; 5) genes relacionados à virulência; 6) captação de ferro; 7) adesão independente de fimbria; 8) biogênese de fimbria/pilus; 9) síntese e secreção de toxinas, segundo descrito em Simpson *et al.* (2000). As categorias funcionais indicadas estão descritas na parte A da figura. O gene 117 corresponde a CDS codificada no plasmídeo pXF51 (mapa não mostrado).

## 1.2. A tecnologia de microarranjos de DNA para análise da expressão gênica global em bactérias

Análises da expressão de genes em resposta a diferentes situações ou condições de cultivo é uma etapa importante na compreensão dos mecanismos envolvidos nos mais diferentes processos celulares. Estes estudos são convencionalmente realizados através de técnicas como o *Northern blot*, ensaio de proteção à ribonuclease e transcrição reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Contudo, apenas um pequeno número de genes pode ser analisado através destas metodologias (Taniguchi *et al.* 2001). Para analisar a expressão de muitos genes simultaneamente com o objetivo de se conhecer o transcrito de um tecido ou organismo, há necessidade da utilização de outras metodologias, tais como sequenciamento em larga escala de EST (Expressed Sequence Tags, (Adams *et al.* 1991)), SAGE (Serial Analysis of Gene Expression, (Velculescu *et al.* 1999)) e hibridização de microarranjos de DNA ou de oligonucleotídeos (Schena *et al.* 1995; Lockhart *et al.* 1996).

Na tecnologia de microarranjos de DNA, fragmentos de DNA dupla fita, como produtos de PCR, ou segmentos de DNA de fita simples, como oligonucleotídeos com tamanho na faixa de 50 a 60 bases, são imobilizados em uma lâmina de vidro, em um arranjo ordenado. Geralmente, cada ponto no arranjo corresponde a um gene específico, podendo existir milhares de pontos nesta lâmina. Estas sondas de DNA imobilizadas no vidro são hibridizadas simultaneamente com cDNA preparados a partir de RNA total ou mRNA isolados de duas amostras (controle e teste) cujo padrão de expressão se deseja comparar. O cDNA proveniente de cada amostra é sintetizado na presença de precursores acoplados a fluoróforos distintos. Alternativamente, pode-se optar pela incorporação indireta dos fluoróforos (conhecida como *post-labeling*). Após a hibridização, o microarranjo é então lavado e a intensidade de fluorescência para cada ponto é determinada após a varredura do microarranjo com lasers capazes de excitar ambos os fluoróforos separadamente. A razão das intensidades dos dois sinais fluorescentes reflete a expressão de cada gene na amostra controle e teste, permitindo a análise da expressão de milhares de genes em um único experimento (Schena *et al.* 1998; Schulze e Downward 2001; Panda *et al.* 2003; Marques e da Silva 2004; Borneman *et al.* 2007).

Na última década, tem sido crescente a utilização bem como o aprimoramento da tecnologia de microarranjos de DNA. Heller (2002) revisou detalhadamente as plataformas disponíveis e as aplicações dessa metodologia em diversas áreas da biologia. Na microbiologia, por exemplo, sua utilização tem sido extradiordinária graças à disponibilidade da sequência completa de dezenas de genomas bacterianos (Lucchini *et al.* 2001; Schoolnik

2002; Dharmadi e Gonzalez 2004). Nestes casos, frequentemente são utilizados como sondas (DNAs imobilizados na lâmina), fragmentos de DNA dupla fita correspondentes ao gene completo ou a um segmento do gene, amplificado por PCR diretamente do DNA genômico ou de clones de bibliotecas genômicas. Mais recentemente, microarranjos de oligonucleotídeos representativos de genomas completos de diversas bactérias já são comercialmente disponíveis ([www.affymetrix.com/](http://www.affymetrix.com/) e [www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com))

Como exemplos da aplicação da técnica de microarranjos de DNA para o estudo do transcrito em bactérias, podemos citar a comparação do perfil da expressão gênica global de *Escherichia coli* cultivada em meio mínimo ou rico e desta bactéria submetida a estresse oxidativo por tratamento com peróxido de hidrogênio. Esta abordagem permitiu a identificação de redes de genes co-regulados em tais situações (Wei *et al.* 2001; Zheng *et al.* 2001). Essa técnica também foi utilizada para análise do perfil global da expressão gênica em outros patógenos animais. Em *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, foi estudado o perfil de expressão gênica em resposta ao antibiótico isoniazida, permitindo a proposição de novos alvos a serem usados no desenvolvimento de drogas (Wilson *et al.* 1999). Em *Staphylococcus aureus*, essa técnica permitiu concluir que a epidemia da síndrome do choque tóxico que ocorreu nos anos 70 foi causada por uma mudança no ambiente do hospedeiro, ao invés de uma rápida disseminação geográfica de uma nova linhagem hipervirulenta (Fitzgerald *et al.* 2001). Microarranjos de DNA foram também utilizados para estudar a expressão gênica global em *Streptococcus* sp. (Smoot *et al.* 2001) e *Pasteurella multocida* (Paustian *et al.* 2001) submetidos a diferentes condições de cultivo, entre elas limitação de ferro. Laub *et al.* (2000) modelaram o circuito genético que controla a progressão do ciclo celular de *Caulobacter crescentus*, pela análise das informações obtidas a partir de microarranjos de DNA contendo aproximadamente 90% de todos os seus genes. Já em *Bacillus subtilis* a comparação do perfil global da expressão gênica de diferentes linhagens mutantes permitiu a identificação de genes cuja expressão é controlada pelos diferentes reguladores que compõem os sistemas de dois componentes (Ogura *et al.* 2001).

Entre vários outros exemplos, trabalhos utilizando a tecnologia de microarranjos de DNA auxiliaram a compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *M. tuberculosis* (Kaushal *et al.* 2002), revelaram novos candidatos à vacina para *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (Grifantini *et al.* 2002) e forneceram mais detalhes sobre processos bem estudados como os sistemas de dois componentes em *E. coli* (Zhou *et al.* 2003) e genes regulados por temperatura em *Campylobacter jejuni* (Stintzi 2003). Além desses, mais recentemente esta metodologia também foi usada com sucesso para desvendar a rede de sinalização envolvida na transição da fase replicativa para a virulenta em *Legionella pneumophila* (Tiaden *et al.* 2007), na seleção de candidatos à vacina para *Dichelobacter nodosus* (Myers *et al.* 2007) e na compreensão da manipulação da homeostase de

fitohormônios mediada por efetores entregues pelo patógeno *P. aeruginosa* (de Torres-Zabala *et al.* 2007), entre muitos outros. Microarranjos de oligonucleotídeos também continuam amplamente empregados, como por exemplo, no estudo de estresse oxidativo em comunidades microbianas anaeróbicas (Tiaden *et al.* 2007).

Entre as condições de cultivo que têm sido exploradas para análise do transcrito bacteriano, está o cultivo frente à carência ou excesso de ferro como será melhor detalhado adiante. Variações na expressão de genes relacionados ao metabolismo de ferro em diferentes fases do crescimento foram verificadas em *Helicobacter pylori* (Merrell *et al.* 2003) e em *E. coli* (Snyder *et al.* 2004). Os genes modulados pelo regulador transcricional Fur já foram investigados em *Neisseria meningitidis* (Grifantini *et al.* 2003), em *Burkholderia* (Tuanyok *et al.* 2005), em *Chlamydomonas reinhardtii* (Maurer *et al.* 2007), em *B. subtilis* (Miethke *et al.* 2006) e *Haemophilus influenzae* (Whitby *et al.* 2006), além de vários outros patógenos animais, possibilitando a definição do estímulo de ferro nestas bactérias. Por outro lado, estudos para definição do estímulo de ferro em fitopatógenos são mais escassos. Em *P. aeruginosa* (Ochsner *et al.* 2002), um patógeno que causa infecções tanto em animais quanto em plantas, foi verificado o aumento da expressão de um conjunto de 333 genes quando esta bactéria foi cultivada na presença do quelante de ferro Chelex.

Assim como para outras bactérias cujo genoma foi elucidado, a tecnologia de microarranjos de DNA também tem sido utilizada na análise do transcrito de *X. fastidiosa*, particularmente de cepas associadas à CVC. O transcrito de células de *X. fastidiosa* da cepa 9a5c recém isoladas de plantas sintomáticas foi comparado com o transcrito de células submetidas ao cultivo *in vitro* (de Souza *et al.* 2003; de Souza *et al.* 2005); evidenciando genes potencialmente relacionados a sua patogenicidade. Este trabalho revelou que genes relacionados com adesão celular, como *fimA*, *uspA1* e *hsf*, com toxicidade, como *cvaA* e com secreção protéica, como *xpsE* são mais expressos na bactéria recém isolada da planta sofrendo uma importante diminuição em sua expressão após cultivo prolongado *in vitro*. Os microarranjos de DNA também foram utilizados na determinação do transcrito da cepa 9a5c frente ao cultivo em alta e baixa concentração de glicose e também em resposta ao estresse térmico e osmótico (Pashalidis *et al.* 2005; Koide *et al.* 2006). Mais recentemente, um conjunto de 21 genes cuja expressão está sob controle do fator sigma RpoE foram evidenciados através da análise do transcrito de um mutante da cepa J1a12, gerado por mutagênese insercional com transposon (da Silva Neto *et al.* 2007).

A tecnologia de microarranjos possibilita além da análise do transcrito, também a comparação de genomas de diferentes cepas ou isolados de uma mesma espécie (Hinchliffe *et al.* 2003; Read *et al.* 2003; Wolfgang *et al.* 2003; Aakra *et al.* 2007). Um estudo pioneiro utilizando microarranjos de DNA possibilitou a descoberta de importantes perdas genômicas entre diferentes cepas vacinais de *M. tuberculosis* (Behr *et al.* 1999). A

comparação entre genomas de diferentes isolados de *X. fastidiosa* obtidos a partir de plantas sintomáticas evidenciou o amplo repertório gênico flexível nessa espécie (Nunes *et al.* 2003). Em nosso grupo de pesquisa, descobrimos potenciais determinantes de virulência ao compararmos, através de microarranjos de DNA, os genomas da cepa virulenta 9a5c e da cepa J1a12, que exibe fenótipo não-virulento em nossos ensaios de infecção em *Nicotiana tabacum* e *Citrus sinensis* (Koide *et al.* 2004).

A expectativa é que ao se utilizar abordagens que incluem microarranjos de DNA e análise de proteomas deverá ser possível transcender a figura estática de um genoma, que é capturada em conjuntos de sequências de DNA e sequências deduzidas de proteínas, para então identificar redes de genes e obter uma melhor compreensão da natureza dinâmica da regulação da expressão gênica em células e tecidos (Nierman *et al.* 2000).

### **1.3. O ferro e sua relação com patogenicidade e virulência de bactérias**

A descoberta há mais de cinquenta anos do efeito bacteriostático da clara do ovo, resultante do sequestro de ferro pela ovotransferrina, foi o ponto de partida para vários estudos sobre o papel do ferro em doenças infecciosas (Schade e Caroline 1946). Desde então, diversos estudos demonstraram que a aquisição de ferro é uma etapa crucial no estabelecimento de infecções em animais, tanto por bactérias Gram-positivas quanto por Gram-negativas, como, por exemplo, as pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Pseudomonas* (Heinrichs *et al.* 1999; Bullen *et al.* 2000). Este processo é de igual importância na colonização de plantas pelas bactérias dos gêneros *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Masclaux e Expert 1995; Expert *et al.* 1996; Wiggerich e Puhler 2000).

Embora o ferro seja o quarto elemento mais abundante em nosso planeta, em ambientes aeróbicos, o estado oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que é predominante, apresenta baixa solubilidade ( $1,4 \times 10^{-9}$  M, em pH 7). As bactérias desenvolveram eficientes sistemas para capturar ferro do meio e que ao mesmo tempo garantem proteção contra os potenciais efeitos tóxicos relacionados à geração de espécies reativas de oxigênio estimulada por ferro (Touati 2000). Esses sistemas incluem: (i) absorção e uso direto de proteínas do hospedeiro que se ligam ao ferro, (ii) redução da forma insolúvel ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para a forma solúvel e assimilável ( $\text{Fe}^{2+}$ ), (iii) degradação enzimática de compostos ligados a ferro e (iv) produção de exotoxinas que eliminam competidores pelo ferro disponível (Braun e Killmann 1999; Vasil e Ochsner 1999; Ratledge e Dover 2000).

Outra estratégia frequentemente empregada por patógenos para aumentar a disponibilidade intracelular de ferro é a produção e secreção de sideróforos, que são

quelantes de baixo peso molecular com alta afinidade por  $\text{Fe}^{3+}$  ( $K_s$  entre  $10^{30}$ - $10^{50}$ ) (Guerinot 1994; Expert *et al.* 1996; Expert 1999; Ratledge e Dover 2000). Por exemplo, para que o fitopatógeno *Erwinia chrysanthemi* prolifere na violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), é necessário um sistema de assimilação de ferro que compreende aproximadamente 25 produtos gênicos envolvidos na biossíntese, excreção e assimilação do sideróforo *chrysobactin*. A expressão destes genes é co-regulada com a de genes de biossíntese de pectinases, envolvidas na degradação da parede celular (Enard *et al.* 1988). Mutantes de *Erwinia* em que genes do sistema de absorção de ferro por *chrysobactin* foram nocauteados tiveram sua capacidade invasiva reduzida, produzindo apenas lesões locais e não sistêmicas ou tiveram um atraso de um ou dois dias no aparecimento de sintomas na planta, ou ainda, não produziram sintomas na planta (Enard *et al.* 1988; Masclaux e Expert 1995; Enard e Expert 2000). Fenótipos semelhantes foram também observados quando genes da via de transporte de ferro mediada por desferrioxamina (DFO), outro sideróforo produzido por *Erwinia*, (Dellagi *et al.* 1998) e o gene *fur* (Franza *et al.* 1999) foram inativados. No fitopatógeno *X. campestris* pv. *campestris*, que causa podridão negra de crucíferas, foi demonstrado que os genes *tonB*, *exxB* e *exbD1* que codificam para proteínas que compõem o sistema de captação de sideróforos- $\text{Fe}^{3+}$  e são integrantes do regulon do ferro em outras bactérias, são essenciais para indução de resposta hipersensitiva na pimenta (*Capsicum annum*) e na couve-flor (*Brassica oleraceae*) (Wiggerich e Puhler 2000).

De um modo geral, as bactérias regulam o metabolismo do ferro em resposta à disponibilidade de ferro no ambiente externo. Em *E. coli*, assim como em muitas outras bactérias, a carência de ferro promove a expressão de dezenas de unidades transcricionais que codificam, por exemplo, componentes do sistema de captação e armazenamento de ferro e do sistema de proteção ao efeito tóxico deste metal. Além disso, os patógenos frequentemente utilizam os baixos níveis de ferro no ambiente como um sinal para a indução de genes de virulência (Litwin e Calderwood 1993; Escolar *et al.* 1999; Ratledge e Dover 2000; Andrews *et al.* 2003).

Em bactérias, a resposta à disponibilidade de ferro é predominantemente controlada pelo produto do gene *fur* (*ferric uptake regulator*). Fur é um homodímero composto de subunidades de ~17kDa que quando ligadas a  $\text{Fe}^{2+}$  atuam como um repressor, associando-se a sequências conhecidas como *Fur box* (ver adiante), ou seja na ausência de  $\text{Fe}^{2+}$ , os genes controlados por Fur são “desreprimidos” (Escolar *et al.* 1999; Hantke 2001). É importante destacar que a expressão de alguns genes é positivamente regulada por Fur. A transcrição destes genes não sofre modulação por elementos do tipo *Fur box* e o mecanismo de regulação aparentemente envolve controle pós-transcricional mediado pela proteína Fur (Dubrac e Touati 2000; Hantke 2001). Mais de 90 genes de várias linhagens de *E. coli* são aparentemente regulados negativa ou positivamente por Fur e ferro. Entre estes,



sessenta codificam para biossíntese e transporte de sideróforos. Quase vinte codificam proteínas citoplasmáticas envolvidas no metabolismo de ferro, como a aconitase A, proteínas de armazenagem, como a bacterioferritina, e proteínas da resposta ao estresse oxidativo, como a superóxido dismutase. Ainda sob regulação da proteína Fur, existem ao menos treze genes que codificam para fatores de virulência, como colicinas e hemolisinas entre outros (Hantke 2001). Este espectro mais amplo de atuação de Fur tem sido também verificado em outras bactérias, onde este regulador também controla a expressão de genes envolvidos na resposta ao choque ácido, na quimiotaxia, no ciclo TCA, na geração de bioluminescência, na proteção contra radicais oxidativos e produção de toxinas e fatores de virulência (Litwin e Calderwood 1993; Sanders *et al.* 1998; Vasil *et al.* 1998; Escolar *et al.* 1999; Ratledge e Dover 2000; Baichoo *et al.* 2002; Bijlsma *et al.* 2002; Andrews *et al.* 2003; Grifantini *et al.* 2003; Merrell *et al.* 2003; Di Lorenzo *et al.* 2004; Subramoni e Sonti 2005; Michel *et al.* 2006; Kitphati *et al.* 2007).

Já foi verificado que regiões promotoras de vários genes regulados de modo dependente de Fur, entre eles o que codifica a superóxido dismutase, aparentemente não possuem a sequência Fur *box*, sugerindo uma atuação indireta de Fur ou uma regulação pós-transcricional (Andrews *et al.* 2003). Ainda, há o exemplo de *sodB* em *H. pylori* que é induzido por ferro através da interação direta de Fur (Dubrac e Touati 2000; Delany *et al.* 2001; Dubrac e Touati 2002).

A descoberta do gene *ryhB* que codifica um ncRNA pequeno (*small non-coding RNA*), cuja transcrição é reprimida pelo complexo  $Fe^{2+}$ -Fur, parece explicar a ativação da transcrição exercida pelo complexo  $Fe^{2+}$ -Fur para alguns genes em *E. coli*. Aparentemente, RyhB atua como um regulador negativo de genes (silenciador) ativados indiretamente por Fur como exemplificado na Figura 3 (Masse e Gottesman 2002; Andrews *et al.* 2003).

Ainda que o papel de Fur seja predominante na modulação da expressão de genes controlados por ferro, relatos recentes apontam para existência de um conjunto de genes que podem ser regulados por ferro de modo independente de Fur. Análises do perfil global de expressão gênica em *N. meningitidis* revelaram que 50% dos genes que são negativa ou positivamente regulados por ferro, não possuem Fur *box* em suas regiões promotoras (Grifantini *et al.* 2003). Ademais, em *B. subtilis*, alguns genes que contem Fur *box* em seus promotores não mostraram regulação evidente por Fur, enquanto outros genes que exibem sequências com pouca ou nenhuma similaridade com a sequência Fur *box* convencional são regulados por Fur (Baichoo *et al.* 2002).

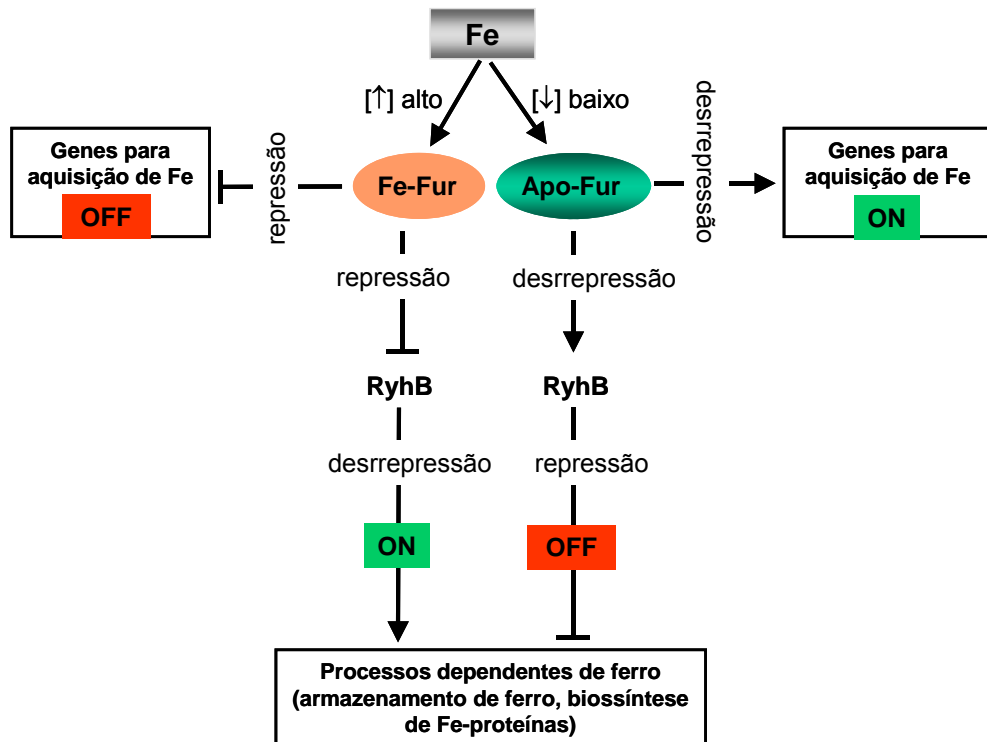
### 1.3.1. Características da sequência Fur box

Como já mencionado, a sequência regulatória comumente encontrada na região promotora de genes regulados por ferro é denominada Fur box (de Lorenzo *et al.* 1987). Esse palíndromo degenerado rico em AT, de aproximadamente 19 pb é o sítio onde se liga a proteína Fur (*Ferric uptake regulator*), que atua, na maioria dos casos, como repressor da transcrição desses genes (Escolar *et al.* 1999). As técnicas mais comumente empregadas no estudo de Fur box são baseadas na interação da proteína Fur com sequências de DNA. Dentre os vários estudos realizados, destacam-se os de proteção do DNA contra a enzima DNase I (*DNase I footprinting*) (de Lorenzo *et al.* 1987), os de ensaios de titulação de Fur (FURTA) (Stojiljkovic *et al.* 1994), os de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA) (Ochsner *et al.* 1995) e o que emprega a evolução *in vitro* de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX) (Ochsner e Vasil 1996).

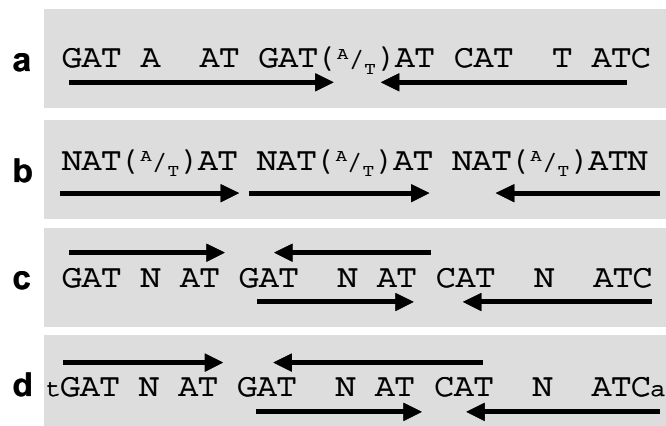
Análises bioinformáticas de genomas completos associadas a estudos de transcritomas e de proteomas frente à carência de ferro possibilitaram a identificação e comparação de elementos do tipo Fur box existentes nos promotores de genes que constituem o regulon de Fur de diversas bactérias (Panina *et al.* 2001; Baichoo *et al.* 2002; Ochsner *et al.* 2002; Thompson *et al.* 2002; Grifantini *et al.* 2003; Merrell *et al.* 2003; Singh *et al.* 2003). Assim, diferentes interpretações do padrão contido na sequência Fur box foram propostas (Friedman e O'Brian 2003). Alternativamente ao modelo de duas repetições de 9pb invertidas (de Lorenzo *et al.* 1987), o consenso foi interpretado como sendo três repetições hexaméricas (Escolar *et al.* 1998) ou ainda como duas repetições invertidas em um modelo 6-1-6 (Lavrrar *et al.* 2002) ou 7-1-7 (Baichoo e Helmann 2002) como esquematizado na Figura 4.

Ortólogos da proteína Fur estão presentes em uma variedade de espécies bacterianas, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas, exibindo um alto grau de similaridade. Portanto era previsível que elementos Fur box sejam também conservados nos promotores de genes regulados por ferro nesses microorganismos. De fato, isso foi confirmado em *P. aeruginosa* (Prince *et al.* 1991), *Legionella pneumoniae* (Hickey e Cianciotto 1994), *Neisseria gonorrhoeae* (Desai *et al.* 1996), *B. subtilis* (Bsat *et al.* 1998) e *E. chrysanthemi* (Franza *et al.* 1999), entre outros. A proteína Fur codificada no genoma sequenciado das quatro cepas de *X. fastidiosa* (9a5c, Temecula1, Dixon e Ann-1) é idêntica e, como esperado, também muito similar a Fur de outras bactérias como mostra o alinhamento apresentado na Figura 5. A similaridade e identidade de Fur de *Xylella* correspondem respectivamente a 61% e 82% com sua ortóloga de *P. aeruginosa*. Assim, é

provável que elementos *Fur box* possivelmente existentes nos promotores de genes de *X. fastidiosa* modulados por Fur sejam também conservados.



**Figura 3. Modelo para interação entre Fur e RyhB como mediadores da regulação dependente de ferro em *E. coli*.** Neste modelo, a transcrição do ncRNA RyhB está sob modulação do regulador Fur. Em alta concentração de  $Fe^{2+}$ , Fur apresenta-se ligado ao metal atuando como repressor da expressão de genes relacionados a processos de captação de ferro e também reprimindo a expressão de RyhB. Quando ocorre carência de ferro, a expressão de genes associados a captação do metal e também de RyhB é ativada. RyhB por sua vez exerce regulação pós-transcricional, reprimindo a expressão de genes associados a processos dependentes de ferro. Esquema adaptado de Massé e Gottesman, 2002; Andrews *et al.*, 2003.



**Figura 4. Interpretações de *Fur box*.** A sequência consenso de 19 pb de *Fur box* pode ser interpretada como uma sequência palindrômica degenerada 9-1-9 pb (a), três repetições hexaméricas (b), duas repetições 6-1-6 (c) ou duas repetições 7-1-7 (d) invertidas que se sobrepõem (de Lorenzo *et al.*, 1988; Griggs e Konisky, 1989; Escolar *et al.*, 1998; Lavrrar *et al.*, 2002; , Baichoo e Helmann, 2002; Baichoo *et al.*, 2002).

```

Xf  -MEL-NDLRKVGKLVTHPRIRILELLEQSSSEHHLSAEDIYRQLLEQGNEIGLATVYRVL 58
Xcc -MET-HDLRKVGKLVTHPRMRILELLEQKSNQHHLAEDIYRQLLDHGDEIGLATVYRVL 58
Pa  MVEN-SELRKAGLKVTLPRVKILQMLD-SAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDVGLATVYRVL 58
Eca MTDNNTALKKAGLKVTLPRKILEVLQ-DPVSHHVSADLYKRLIDMGEEIGLATVYRVL 59
Ec  MTDNNTALKKAGLKVTLPRKILEVLQ-EPDNHHVSAEDLYKRLIDMGEEIGLATVYRVL 59
      :      *:*_***** **::**::*: . . .:*:*****: *:: *:::*****

Xf  TQFEAAGLVLKHNFESGQAVYEIDRGGHHDHMVDVDTGKIIIEFHNEEIELLQRSIAAERG 118
Xcc TQFEAAGLVLKHNFEGDQAVYELDRGGHHDHMVDVDTGHVIEFESEIEALQRQIAAKHG 118
Pa  TQFEAAGLVVRHNFDDGGHAVFELADSGHHDHMVCVDTGEVIEFMDAEIEKRQKEIVRERG 118
Eca NQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKVIEFRDESIEARQREIAERHG 119
Ec  NQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKVIEFSDDSIEARQREIAAKHG 119
      .**: **:* :****:..::**:: *****: :* *.:*** . .** *:.*. .:*

Xf  YELEEHSVLVLY-----VRKKRGR----- 136
Xcc YELEEHSVLVLY-----VRKKRPR----- 136
Pa  FELVDHNLVLY-----VRKKK----- 134
Eca IKLSNHSLYLYGHGHCSEGDREDETLHDSTR 149
Ec  IRLTNHSLYLYGHGCAEGDREDEHAHEGK- 148
      . * :*. * **          *:. .

```

**Figura 5: Comparação da sequência de aminoácidos de Fur de *X. fastidiosa* com ortólogos de outras bactérias.** As sequências de aminoácidos preditas para Fur de *Xylella fastidiosa* (Xf), *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc), *P. aeruginosa* PAO1 (Pa); *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043 (Eca); *Escherichia coli* K12 (Ec) foram obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). A numeração à direita corresponde à posição do resíduo na sequência. As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W. (\*) indica resíduos idênticos, (:) indica substituição conservativa e (.) indica substituição semi-conservativa. O traço indica o domínio de ligação ao DNA “YRVLTQ” identificado na Fur de *P. aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003).

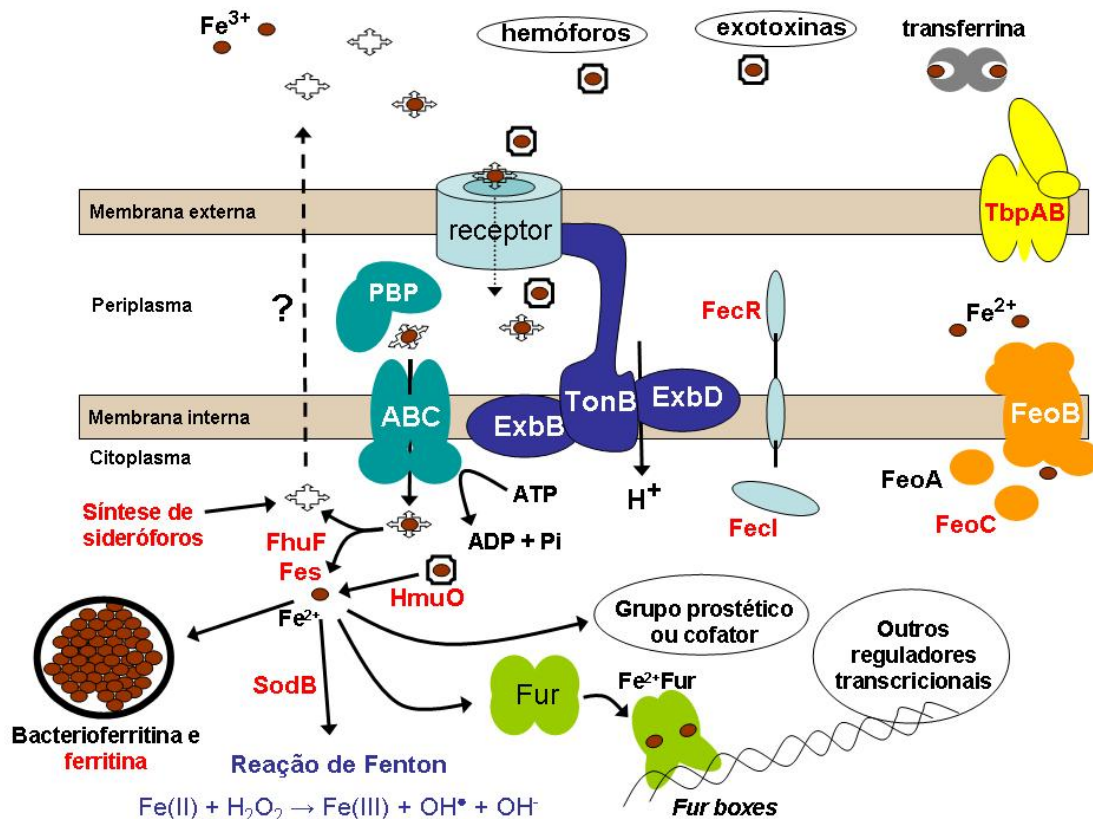
### 1.3.2. O metabolismo de ferro em *X. fastidiosa*

De acordo com a anotação do genoma de *X. fastidiosa*, existem ao menos 67 genes envolvidos com o metabolismo de ferro no genoma da cepa 9a5c (Simpson *et al.*, 2000). Eles codificam para proteínas potencialmente relacionadas a captação, armazenagem, uso e regulação do metabolismo de ferro. A maioria são enzimas que usam ferro como cofator ou grupo prostético. Apesar desse vasto conjunto, em *X. fastidiosa* não foram encontrados genes de biossíntese de sideróforos, tanto de catecolatos quanto de hidroxamatos ou carboxilatos. Essa situação também é observada no gênero *Neisseria* é capaz de internalizar sideróforos sintetizados por outras fontes (xenosideróforos) (Crosa *et al.* 2004).

Em *X. fastidiosa* não foram descritos até o momento receptores para sideróforos dos tipos hidroxamatos ou carboxilatos, embora a CDS XF0599 possua 25% de identidade com o receptor FoxA de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043. Curiosamente em *X. fastidiosa* não há ortólogos dos genes *fes* e *fhuF*, que codificam uma esterase responsável pela degradação de sideróforos do tipo catecolato e uma redutase capaz de remover o ferro de sideróforos do tipo hidroxamatos, respectivamente.

Além de sideróforos, é comum o uso de dicitrato férrico como fonte desse metal (Crosa *et al.* 2004). Provavelmente *X. fastidiosa* seja incapaz de usar dicitrato férrico, uma vez que ortólogos da proteína periplasmática FecB e do sistema de dois componentes FeoR não foram identificados em seu genoma. Ainda sobre a captação de ferro, o sistema Feo (transportador de ferro livre) codificado no genoma de *X. fastidiosa* não possui o componente citoplasmático FeoC. Essa situação é observada na maioria das bactérias estudadas (Crosa *et al.* 2004). Outra fonte de ferro utilizada por patógenos é o sequestro de transferrina, uma proteína quelante de ferro extracelular de hospedeiros animais e vegetais. No entanto, ortólogos de *tbpA* e *tbpB* (receptores de transferrina) não foram identificados em *X. fastidiosa*.

O genoma de *X. fastidiosa* codifica três toxinas similares à hemolisinas. Também há três cópias similares à hemaglutininas, com possíveis funções em adesão celular e sequestro de ferro extracelular. Resta saber a funcionalidade dessas prováveis exotoxinas e hemóforos no interior dos vetores e hospedeiros vegetais. Além disso, em relação à armazenagem de ferro, o genoma de *X. fastidiosa* codifica para uma proteína da família das bacterioferritinas distinta das ferritinas. A figura 6 destaca os principais componentes relacionados ao metabolismo de ferro codificados no genoma de *Xylella*.



**Figura 6. Metabolismo de ferro em *Xylella fastidiosa*.** Esquema comparativo dos vários sistemas de captação e aproveitamento de ferro encontrado em bactérias Gram-negativas e no gênero *Xylella*, de acordo com as anotações genômicas feitas por Simpson *et al.* (2000), Bhattacharyya *et al.* (2002) e Van Sluys *et al.* (2003). Através da secreção de hemóforos e exotoxinas essas bactérias conseguem promover a liberação de ferro proveniente de proteínas do hospedeiro e outros microorganismos. O receptor colorido em azul claro representa os receptores inseridos na membrana externa conhecidos como "*beta-barrels*". As respectivas proteínas ligantes localizadas no periplasma (PBP) e sistemas de canais inseridos na membrana interna que promovem o transporte de compostos férricos com consumo de energia (ABC) estão indicadas. Os sistemas e/ou componentes ainda não descritos em *Xylella* estão marcados em vermelho, entre eles uma via biossintética de sideróforos, as enzimas responsáveis pela degradação de sideróforos do grupo dos catecolatos (Fes), redução do átomo de ferro quelado por sideróforos do grupo dos hidroxamatos (FhuF) ou do grupo heme (HmuO), Fe-superóxido dismutase (SodB), sistema de dois-componentes sensor da disponibilidade de dicitrato férrico (FecRII), proteínas ligantes de transferrina (TbpAB) e membro do sistema de captação de ferro não complexado (FeoC).

## 2. OBJETIVOS

Diversos estudos demonstraram que a aquisição de ferro é uma etapa crucial no estabelecimento de infecções tanto em animais como em plantas (Expert *et al.* 1996; Bullen *et al.* 2000). A estas observações somam-se vários trabalhos em que já foi demonstrada a influência da disponibilidade de ferro sobre a expressão de diversos fatores de patogenicidade e virulência em bactérias (Masclaux e Expert 1995; Heinrichs *et al.* 1999; Oh e Beer 2005). Existem ao menos 67 genes potencialmente relacionados ao metabolismo de ferro, incluindo genes que codificam para receptores de captação de ferro e reguladores da expressão de genes responsivos ao ferro (Simpson *et al.* 2000; Bhattacharyya *et al.* 2002a; Van Sluys *et al.* 2003). Entre estes genes, está Fur, um importante regulador da expressão de genes responsivos ao ferro em diversas bactérias.

Como esquematizado na Figura 6, *X. fastidiosa* dispõe potencialmente de diferentes mecanismos para garantir a homeostase de ferro que certamente é fundamental para colonização do hospedeiro. Alguns autores já propuseram que a tomada de ferro e, talvez, de outros metais de transição pela *X. fastidiosa*, deplete o xilema destes micronutrientes contribuindo para a clorose típica das folhas que é observada em plantas infectadas (Hopkins 1989; Simpson *et al.* 2000). Vale ressaltar, entretanto, que genes relacionados à biossíntese de sideróforos não foram ainda determinados no genoma desta bactéria embora seu genoma codifique para mais de um receptor de sideróforos. Já foi relatado de forma não conclusiva que *X. fastidiosa* aparentemente produz compostos ferro-quelantes (Silva-Stenico *et al.* 2005).

Neste contexto, propusemos como objetivo principal deste trabalho descrever as diferenças no transcrito de *X. fastidiosa* cepa 9a5c, agente causal da CVC, quando submetida ao cultivo *in vitro* em excesso e carência de ferro. Esta abordagem, já utilizada para outros patógenos, tem facilitado a descrição do estímulo do ferro, que inclui, como já mencionado, genes diretamente relacionados ao metabolismo deste metal e genes importantes para sua patogenicidade e virulência.

Como abordagem metodológica para análise do transcrito de *X. fastidiosa*, optamos pela utilização da técnica de microarranjos de DNA, seguindo-se a validação de um conjunto selecionado de genes por RT-PCR quantitativa. Assim, investimos primeiramente, no planejamento e construção de microarranjos de DNA representativos das sequências codificadoras anotadas no genoma de *X. fastidiosa* 9a5c (Koide *et al.* 2004). Além disso, para implicar ou não o regulador Fur na modulação da expressão gênica em *X. fastidiosa*, propusemos avaliar a afinidade da proteína recombinante Fur de *X. fastidiosa* com sequências Fur *box* putativas identificadas em regiões promotoras de alguns dos genes com expressão diferencial frente ao cultivo em excesso e carência de ferro.

### 3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1. Cultivo de *Xylella fastidiosa*

*Xylella fastidiosa* cepa 9a5c (Li *et al.* 1999) foi crescida em meio complexo PW (Davis *et al.* 1981). O meio PW é constituído de: fitona peptona 4 g/L; peptona de caseína com digestão tríptica 1 g/L; cloreto de hemina 0,001% (p/v) (~1 uM de ferro total); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,4 g/L; glutamina 0,4% (p/v) e glicose 0,5% (p/v). Devido a seu crescimento lento, as células são normalmente mantidas por uma semana no meio de cultura (equivalente a uma passagem) antes de serem diluídas para um novo cultivo. A partir de um estoque de células com 15 passagens semanais cedido pelo Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura, Cordeirópolis, SP), o cultivo foi feito em meio PW sólido por uma semana a 28°C. As células foram então transferidas para 50 mL de meio PW para DO<sub>600nm</sub> ≈ 0,03 e cultivadas nas mesmas condições, com 80 rpm de agitação. A cultura foi diluída para 500 mL e após aproximadamente sete dias, as células foram coletadas por centrifugação a 3.220xg por 5 minutos a 4°C ou submetidas ao tratamento desejado. Nessas condições de crescimento, o biofilme formado por esta cepa de *Xylella* é visível na parede do frasco após alguns dias. Após o crescimento por sete dias, adicionamos 200 uM de 2.2'-dipiridil (Sigma), um potente quelante de ferro (Dr. Phillip Klebba, Oklahoma State Univ., comunicação pessoal) para exposição das células a carência de ferro. Para a exposição das células ao excesso de ferro, 100 uM de pirofosfato férrico (Sigma) foi adicionado a cultura em meio PW. Após tratamento, por tempos que variaram de 0 a 960 minutos, amostras de 50 mL foram coletadas por centrifugação a 3.220xg por 5 minutos a 4°C. Os precipitados de células foram congelados e armazenados a -80°C e/ou utilizados para extração de RNA total. Para extração de DNA genômico utilizamos precipitados de células obtidas após cultivo por sete dias em meio PW como descrito acima.

#### 3.2. Extração de DNA genômico de *X. fastidiosa*

Para purificação de DNA genômico, o precipitado de *X. fastidiosa* obtido a partir de 250 mL de cultura em meio PW foi lavado com 30 mL de TE50 (Tris-HCl 50mM, EDTA 50mM, pH 8,0) por centrifugação a 6.000xg por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 3,5 mL de TE50 acrescido de Tween 20 0,5% (v/v) e Triton X-100 0.5% (v/v), seguindo-se adição de 100 uL de RNase A 100 mg/mL, 80 uL de lisozima 100 mg/mL e 100 uL de proteinase K 20mg/mL. Após incubação a 30°C por 60 minutos, foi adicionado 1,2 mL de



solução de cloridrato de guanidina 3M contendo Tween 20 20% (v/v). A suspensão foi misturada por inversão do tubo. Após incubação a 50°C por 30 minutos, foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (v/v), seguindo-se agitação vigorosa e separação da fase aquosa por centrifugação a 10.000xg por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e extraída com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1 (v/v). A fase aquosa foi separada por centrifugação nas mesmas condições e o DNA foi precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de potássio 3 M, pH 5,5 e 0,6 volume de isopropanol à fase aquosa. O tubo foi centrifugado a 5.000xg por 20 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado em 2 mL de etanol 70% (v/v) resfriado a -20°C e centrifugado nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco por centrifugação a vácuo (Eppendorf concentrator 5301) por 5 minutos e ressuspenso em 300 uL Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. A concentração do DNA foi estimada pela medida da absorbância a 260 nm, sendo que  $Abs_{260nm} = 1$  equivale a 50 ug de DNA fita dupla /mL.

Em alguns experimentos utilizamos um protocolo simplificado para obtenção do DNA genômico. Neste protocolo o precipitado de *X. fastidiosa* obtido a partir de 250 mL de cultura em meio PW foi ressuspenso com 400 uL de TES (Tris-HCl 50 mM, NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH7.5) seguindo-se adição de de sarcosil 1% (v/v) e proteinase K 100ug/mL. Após incubação a 37°C por 30-60 minutos, foi adicionado 400 uL de acetato de amônio 4M. A suspensão extraída duas vezes com igual volume de fenol/clorofórmio e uma vez com clorofórmio. O DNA foi precipitado pela adição de igual volume de isopropanol à fase aquosa e incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. O tubo foi centrifugado a 2.000xg por 10 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 400 uL de acetato de sódio 0,1M pH 6,0. O DNA foi novamente precipitado pela adição de 800 uL de etanol e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi centrifugado por 15 minutos a 10.000xg em temperatura ambiente. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente, agora a 5.000xg por 5 minutos. O precipitado foi seco por 20 minutos a temperatura ambiente e depois ressuspenso em 100 uL e dosado em espectrofotômetro.

### **3.3. Extração de RNA total de *X. fastidiosa***

RNA total de *X. fastidiosa* foi purificado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Para tal, o precipitado de células obtido a partir de 50 mL de cultura em meio PW submetida ou não aos tratamentos de interesse, foi ressuspenso em 1 mL de Trizol, seguindo-se incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 0,2 volumes de clorofórmio, o tubo foi submetido à

agitação vigorosa e incubação por mais 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 16.000xg por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para novo tubo. A esta fase foi adicionado 0,5 volume de isopropanol seguindo-se incubação por 10 minutos. O tubo foi então centrifugado a 16.000xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com igual volume de etanol 75% (v/v) por centrifugação nas mesmas condições. O etanol foi desprezado e o precipitado foi seco por centrifugação a vácuo (Eppendorf concentrator 5301) por 5 minutos. O precipitado de RNA foi ressuspensão em 50 uL de água livre de RNase e a amostra foi aquecida por 10 minutos a 65°C. Após ressuspensão, a concentração e a pureza do RNA total foram estimadas pela medida da absorbância a 260nm e 280nm, sendo que  $Abs_{260nm} = 1$  equivale a 40 ug de RNA/mL quando a razão  $A_{260nm}/A_{280nm} \approx 1,8$ . A integridade do RNA total obtido foi avaliada pela análise da proporção relativa das bandas dos rRNAs 16S e 23S em eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. Em alguns experimentos a qualidade e quantidade do RNA total foi avaliada no aparelho BioAnalyser (Agilent). O RNA total isolado foi tratado com RQ1 DNase livre de RNase (Promega) para remoção de DNA genômico contaminante, seguindo-se extração fenol/clorofórmio, precipitação com etanol e nova avaliação da quantidade e pureza como descrito acima.

### **3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As PCRs foram geralmente realizadas em soluções contendo 0,2-1 uM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada dNTP (Stratagene), tampão da Taq DNA polimerase, 1 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de  $MgCl_2$  e 50-100 ng de DNA em um volume final de 50 uL, seguindo-se as especificações determinadas pelo fabricante da enzima. As condições de programação dos ciclos do termociclador (Perkin Elmer) foram: desnaturação inicial por 4-5 minutos a 94-95°C, seguida de 35-40 ciclos de 30 segundos-1 minuto a 94-95°C, 30 segundos-1 minuto a 50-55°C (variável de acordo com a  $T_m$  do oligonucleotídeo) e 1 minuto a 72°C. Por fim, o produto da reação foi armazenado a 4°C ou congelado a -20°C. Os oligonucleotídeos para as PCRs foram encomendados junto a fornecedores especializados (Invitrogen, Integrated DNA Technologies, MWG Biotech ou Operon Inc.).

### 3.5. Eletroforese de DNA e RNA em gel de agarose

A amostra de DNA a ser analisada foi previamente misturada com 0,1 volumes de tampão de amostra [azul de bromofenol 0,25% (p/v) e sacarose 40% (p/v)] e a eletroforese foi realizada em gel de agarose [0,7-1,2% (p/v)] contendo 0,5 ug/mL de brometo de etídio, a 80-90 V em TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A corrida foi interrompida após o corante ter percorrido aproximadamente 4/5 da distância entre o local da aplicação e o limite inferior do gel. O gel foi fotografado sob luz UV e os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos.

A amostra de RNA (1-5 ug) a ser analisada foi misturada com 3 vezes o volume de tampão de amostra [formamida 65% (v/v), MOPS 10X 12% (v/v), formaldeído 8% (v/v), azul de bromofenol 3% (p/v) e brometo de etídeo 0,5 mg/mL], preparado em água livre de RNase imediatamente antes da aplicação em gel de agarose contendo formaldeído [agarose 1,25% (p/v) e MOPS 1X contendo 16% (v/v) de formaldeído, adicionado após a fusão da agarose]. A solução de MOPS 10X corresponde a MOPS ácido 4,1% (p/v), acetato de sódio 0,4% (p/v) e EDTA 0,028% (p/v). A água livre de RNase corresponde a água deionizada previamente tratada com dietilpirocarbonato como descrito na literatura (Ausubel 1995). A eletroforese foi realizada em baixa voltagem (40-60 V) em aparato mantido livre de contaminação com RNase.

### 3.6. Análise de expressão gênica com microarranjos de DNA

Os microarranjos de DNA de *X. fastidiosa* foram construídos no laboratório de microarranjos (CAGE Lab) instalado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, pela deposição automatizada em lâminas de vidro de fragmentos de DNA fita dupla correspondentes a segmentos das CDS anotadas no genoma completamente sequenciado da cepa 9a5c (Simpson *et al.* 2000; Koide *et al.* 2004). O planejamento e construção deste microarranjo contaram com a participação de Adriana Matsukuma e dos Drs. Tie Koide, Leandro M. Moreira, Alan M. Durham, Suely L. Gomes e Sergio Verjovski-Almeida.

### 3.6.1. Amplificação e purificação dos fragmentos CDS-específicos por PCR

Os fragmentos de DNA fita dupla de 250-1000 pb CDS-específicos foram produzidos por métodos convencionais de amplificação por PCR, em placas de 96 poços, usando DNA genômico ou os plasmídeos pXF51 e pXF1.5 isolados de *X. fastidiosa* cepa 9a5c como molde e pares de oligonucleotídeos CDS-específicos em cada poço. Após testes variados, e levando-se em conta a relação custo/benefício, optamos pela utilização de 1U da enzima Biolase (Bioline) nas PCRs. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,5 ug/mL de brometo de etídio. Diferentes condições foram testadas para obtenção do melhor rendimento sem perda da especificidade. Uma PCR típica consistia em: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Para aumentar a concentração dos produtos de PCR realizados com primeiro lote de oligonucleotídeos adquiridos da MWG Inc., foi necessária re-amplificação a partir de 2 uL de uma diluição 200 vezes das reações de PCR originais. Os produtos assim obtidos foram novamente avaliados por eletroforese em gel de agarose e armazenados a -80°C. No caso do segundo lote de oligonucleotídeos (Operon Technologies) não foi necessária a etapa de re-amplificação, pois a concentração de produto obtida na amplificação já era suficiente para deposição nas lâminas de vidro. Em alguns poucos casos a amplificação foi realizada a partir de clones selecionados da biblioteca genômica de 1056 cosmídeos preparada durante o projeto de sequenciamento de *X. fastidiosa* e que nos foi gentilmente cedida pelo Prof. Jesus Ferro do *Brazilian Clone Collection Center*, UNESP, Jaboticabal. A sequência dos pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificação das CDS de *X. fastidiosa* está disponível em <http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray/Construction/> (Koide *et al.* 2004).

Os produtos da amplificação/re-amplificação foram purificados em placas de filtração Multiscreen (Millipore MAFB NOB 50). Inicialmente 10 uL de tampão [guanidina-HCl 7M, MES (*free acid*) 200 mM, MES (*sodium salt*) 20 mM, pH 5,6] foi adicionado em cada poço da placa e esta centrifugada a 1250xg por 1 minuto. Em seguida, 100 uL deste mesmo tampão foi misturado aos 100 uL do produto de PCR e o volume total foi transferido para a placa filtradora umedecida. Esta foi centrifugada como anteriormente e depois lavada duas vezes com etanol 80% (v/v), sendo a segunda centrifugação por 10 minutos. Os produtos foram eluídos após 1 minuto de incubação com 50 uL de Tris-HCl 10 mM pH 8, pré-aquecido a 45°C, e centrifugação como anteriormente descrito.

Os produtos de PCR purificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose e foto-documentados. Uma estimativa da concentração de DNA foi realizada pela

comparação com padrões de quantidade conhecida aplicados no gel de agarose. Reações de má qualidade (ausência, inespecificidade ou tamanho incorreto de produto) foram registradas para serem filtradas em análises posteriores. As placas de 96 poços foram combinadas manualmente em placas de 384 poços, que é o formato de placa para carregar o *spotter*.

### 3.6.2. Confeção dos microarranjos de DNA de *X. fastidiosa*

Às placas de 384 poços contendo os produtos de PCR purificados, adicionamos igual volume de DMSO para que a concentração final de DNA fosse entre 200-400 fmol/uL. Os produtos de PCR correspondentes ao conjunto de CDS de *X. fastidiosa* foram depositados em lâminas espelhadas tipo 7 (GE Healthcare), usando o equipamento *Generation III Microarray Spotter* (GE Healthcare). Fotos deste e dos demais equipamentos utilizados podem ser encontradas em uma visita virtual ao laboratório de microarranjos CAGE Lab, no endereço <http://bioinfo.iq.usp.br/cagelab>. Este *spotter* permite a deposição de até 4608 amostras de DNA organizadas em 12 subconjuntos (*subarrays*) de 384 pontos (12 linhas x 32 colunas). O conjunto total de 4608 amostras é depositado em duplicada nas duas metades longitudinais da lâmina, configurando o que chamamos de *set A* e *set B*, os quais são considerados como réplicas técnicas. Após a deposição dos fragmentos de DNA, as lâminas foram submetidas a 50 mJ de luz UV, para que fitas de DNA sejam covalentemente fixadas. As lâminas assim obtidas foram armazenadas em dessecador (umidade relativa ~15%) por no máximo seis meses.

### 3.6.3. Preparação de cDNA marcado e hibridização com os microarranjos

RNA total de *X. fastidiosa* livre de DNA genômico, preparado como descrito no item 3.3, foi utilizado para geração de cDNA fita simples fluorescente utilizando-se o kit *SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Geralmente, a síntese de cDNA foi realizada a partir de 40 ug de RNA total na presença de 5 ug de oligonucleotídeos nonaméricos aleatórios. Após a síntese, híbridos de RNA/cDNA foram desnaturados por 10 minutos a 70°C e o RNA foi hidrolisado por tratamento com NaOH. Em seguida foi adicionado 120 uL de tampão (guanidina-HCl 5,3 M, acetato de potássio 150 mM pH 4,8) a cada reação e essas transferidas para uma placa de purificação de 96 poços. Após centrifugação a 1.250xg por 1 minuto a 25°C, o filtrado foi descartado e o poço lavado com 200 uL de etanol 80% (v/v) por 4 vezes, realizando-se centrifugação por 1 minuto a 25°C entre cada lavagem. Uma última centrifugação adicional

por 3 minutos foi feita para completa secagem dos filtros. As amostras de cDNA foram eluídas duas vezes com 50 uL de 10 mM Tris-HCl pH 8 pré-aquecido a ~50°C, centrifugando-se por 2 minutos a 1.250xg. O cDNA sintetizado em cada amostra foi quantificado medindo-se a absorbância em 260 nm e em 280 nm. Em seguida as amostras foram secas sob centrifugação a vácuo e ressuspensas para a reação de ligação do cDNA ao fluoróforo, de acordo com as instruções do fabricante. Após uma nova etapa de purificação, o cDNA recuperado em cada amostra foi quantificado medindo-se a absorbância em 260 nm e em 280 nm. O fluoróforo total incorporado em cada amostra foi quantificado medindo-se a absorbância em 550 nm (Alexa Fluor 555 ou AF555) e em 650 nm (Alexa Fluor 647 ou AF647). As amostras foram secas novamente e ressuspensas em água deionizada. Hibridizações na presença de formamida 50% (v/v) e tampão de hibridização (GE Healthcare) foram realizadas por ~16 horas em câmaras umedecidas e aquecidas a 42°C. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas com solução de SSC 1x/SDS 0,2% por 10 minutos a 55°C; duas vezes com SSC 0,1x/SDS 0,2% também por 10 minutos a 55°C cada; SSC 0,1x por 10 minutos à temperatura ambiente e finalmente mergulhada 3-4 vezes em água deionizada. As soluções de SSC 20x e SDS 20% (p/v) (USB Corporation) utilizadas nas lavagens foram filtradas em membranas com poros de 0,22 um. Imediatamente após as lavagens, as lâminas foram secas sob gás nitrogênio e analisadas no *Generation III Scanner* (GE Healthcare) para obtenção das imagens que refletem a intensidade de fluorescências dos pontos do microarranjo.

Foram realizadas várias hibridizações com cDNA preparado a partir de amostras de RNA obtidas em pelos menos quatro experimentos independentes.

#### **3.6.4. Detecção, quantificação e normalização dos sinais de fluorescência**

Após a varredura dos microarranjos, as intensidades brutas do sinal das imagens foram extraídas usando o programa Array Vision 6.0 (Image Research/Molecular Dynamics). Após a subtração do ruído local de cada ponto do microarranjo, a densidade de fluorescência média removida de artefatos (MTM Dens) foi coletada. Esta ferramenta do Array Vision permite a exclusão de pixels dentro do ponto que mostrem intensidade de sinal acima ou abaixo de quatro desvios absolutos da mediana (MADs) da intensidade do sinal de todos os pixels do ponto. Essa é uma maneira de eliminar sinais artefatuais derivados, por exemplo, de partículas de poeira e imperfeições de deposição. Em seguida, para cada ponto foi calculada a razão das intensidades de sinal dos canais ( $I_{AF555} + I_{AF647}$ ) e construído um gráfico que representa a razão de cada ponto em função da intensidade média do sinal nos dois canais [gráfico M vs S, onde  $M = \log_2(I_{AF647} / I_{AF555})$  e  $S = \frac{1}{2} * \log_2(I_{AF647} + I_{AF555})$ ], para cada

lâmina. Neste espaço, as razões foram normalizadas usando um algoritmo de regressão linear com peso local (Lowess), implementado usando o pacote R (<http://www.r-project.org/>) para corrigir influências sistemáticas nos dados, originadas de pequenas diferenças na marcação e/ou eficiência de detecção entre os corantes fluorescentes (Yang *et al.* 2002). Após normalização, os dados com valor  $S < 3,2$  foram filtrados devido ao baixo sinal, próximo ao ruído. Análises posteriores e seleção de CDS foram feitas com os dados normalizados e filtrados. Essa etapa, bem como os itens 3.6.5. e 3.6.6. foram feitos em colaboração com o Dr. Ricardo Zorzetto N. Vencio.

### 3.6.5. Determinação dos intervalos de credibilidade para as razões dos sinais

Inicialmente, a variação experimental intrínseca das razões de fluorescência dos dois canais foi estimada a partir de três hibridizações homotípicas (a mesma amostra é marcada com AF555 e AF647, também denominada *self-self*) utilizando-se cDNA preparado a partir de RNA obtido de culturas controle (crescimento em meio PW sem adição de 2,2'-dipiridil ou pirofosfato férrico). Nessas condições a razão esperada é 1:1 para toda a faixa de intensidade de sinal. Baseado no ruído de hibridização observado, intervalos de credibilidade de 98% foram estimados para faixas de intensidade e os pontos fora dos intervalos de credibilidade foram considerados promissores, ou diferencialmente expressos. Um ponto dentro de um intervalo de credibilidade, embora possivelmente apresente razão diferente de 1:1 (zero na escala  $\log_2$ ), foi considerado igualmente expresso nas duas condições. Desta forma foi estimado o ruído experimental intrínseco das razões de hibridização ao mesmo tempo em que foram preservados os genes que são apenas sutilmente diferencialmente expressos. Consideramos essa alternativa superior ao limite "duas vezes mais ou menos expresso" comumente utilizado em estudos com microarranjos (Zhou *et al.* 2000; Quackenbush 2002). Uma ferramenta para realização automatizada desse processo está publicamente disponível (Vencio e Koide 2005).

### 3.6.6. Classificação das CDS

Uma CDS foi considerada significativamente mais expressa em relação ao controle (sem tratamento) se possui maioria simples de suas réplicas fora do intervalo de credibilidade de 98%, ou seja, se somente dois pontos de dados estão disponíveis, ambos devem estar fora do intervalo; com três pontos, no mínimo dois devem estar fora, e assim sucessivamente. Este teste estatístico utilizado é um teste Bayesiano conceitualmente equivalente a um teste clássico bi-caudado com  $p\text{-value} < 0.01$ , isto é, cuja distribuição sob

a hipótese nula “não existe expressão diferencial” engloba uma densidade equivalente a  $1 - 2 \times 0.01 = 0.98$ . Este processo foi realizado utilizando-se a ferramenta HTSelf publicamente disponível (Vencio e Koide 2005). Para cada CDS dispúnhamos de 2 a 24 dados de razão de expressão considerando as réplicas técnicas e biológicas e os filtros aplicados ao longo do processo de análise. Uma CDS diferencialmente expressa possui maioria simples de suas réplicas fora do intervalo de confiança, ou seja, se somente dois pontos de dados estão disponíveis, ambos devem estar diferencialmente expressos; com três pontos, no mínimo dois devem estar diferencialmente expressos, e assim sucessivamente. O agrupamento dos genes de acordo com o perfil de expressão foi feito utilizando a ferramenta *K-means clustering* com medida de similaridade por distância euclidiana (Sherlock 2000). Essa ferramenta faz parte do pacote de análise de expressão gênica do programa SpotFire 8.2 (TIBCO Software Inc.).

### 3.7. PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR)

Para geração de cDNA utilizamos 5 µg de RNA total livre de DNA, 200 U da transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) e 500 ng de oligonucleotídeos nonaméricos aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído com água livre de nuclease para 125 µL e armazenado a -20°C até o uso. PCR quantitativa em tempo real foi feito no equipamento ABI PRISM 5700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) usando parâmetros padrão. A mistura da PCR incluía 10 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 800 nM de cada oligonucleotídeo e 5 µL da solução do cDNA diluído para 125 µL. Para confirmar a geração de produtos específicos, a PCR foi imediatamente seguida por análise da curva de fusão do produto de PCR (*melting curve analysis*), de acordo com as recomendações do fabricante do equipamento. As sequências dos pares de oligonucleotídeos foram planejadas com o programa PRIMER EXPRESS 2.0 (Applied Biosystems). O par de oligonucleotídeos específicos para a CDS XF2157 (DNA polymerase III, cadeia epsilon) foi utilizado como controle para normalizar a quantidade de RNA total por amostra. A razão de expressão em cada amostra, em relação ao tempo zero, foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , como descrito em (Livak e Schmittgen 2001) a partir de reações realizadas em triplicatas a partir de cDNA preparado do RNA obtido de duas amostras de experimentos independentes (réplicas biológicas), distintas das utilizadas nos experimentos de hibridização de microarranjos. Consideramos uma CDS como diferentemente expressa em relação ao tempo zero quando a razão obtida descontada de dois desvios padrões das médias das triplicatas for diferente da obtida para a mesma CDS



no tempo zero. Os oligonucleotídeos específicos para cada CDS utilizados nos ensaios de RT-qPCR estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-qPCR.

CDS	Oligo direto	Oligo reverso
XF0033	GTGGTGGTGATCGTGGCTATC	GTTCTGAGAATGCTCCCTTGGT
XF0083	GCTCGTACACCGTTACCATT	GGGCCTGGCTCAAAATAGGT
XF0185	CGAGTCGATGCAACAACAAAA	CCCTCCGCTTCTAGGATGGT
XF0216	CTTTAGAGCCAGCTGCTTTGG	CGCTTCCATCTGCACACAAG
XF0261	AATCCCAGCGACGTTAATGAA	CCAAAAGCCGGCCAAAC
XF0262	GGCGGTATTGCTGGTGCTAT	AGCGAAGGTGCCGTTAAAGA
XF0263	TCGGCGTTTCTGCCTTTTT	CCACCGCGGGTTCCA
XF0264	GCGACTTTGCTACGCGTCTT	CAGCAAAAAAGCAGCAATGC
XF0290	GACGCCGCAATGAAGTACAA	CCGTAATCCTTTCCAGCGATT
XF0320	CGCAGCTTTCTGGCACTCA	GGCAGTAATCACCGCCAAA
XF0371	GCATCTTGGTCGGCTTTTTTA	GCTCGCGCTCTTTACCTTCA
XF0395	TGGATGGTTTGCCGAATTTT	TGCCAAATCGCCACTGAATA
XF0568	CGACTTGCTTGGCAGCTTTC	AACTCGTCAGCATGGAGCGTAT
XF0599	CAGCACACGGACACAAATCAG	GATCCGGTCCCATAGAAGTTTTT
XF0767	CCCGGTACGGTTGATGTTG	TTCAAGTTCACCGACGGAGAA
XF0800	TGGCGCTTTATAAGGCTTCGT	ATCCATCTGCAACCAACTCACA
XF0889	CTGGATCAAGACAAGGTCAAGGA	AGGTCGTCTTGCAGGCTGTACT
XF0933	CCGCCGGATGTGTTGGT	TTCCAGTACAAAACGCAAATGC
XF1147	ACGAAATCATCGAACAAGCTCAT	CAGTGATTGCTTCAGCTTTTGC
XF1216	GGCACCTCCAAATCAAACA	CCTGCATCTGGCTCGTGTA
XF1220	TCACTGGCATAGCGCTTGAA	TGAAATTGAAGGCGGTGTTT
XF1300	ATCCCCTGGTGTGCCTATCC	CGGTTTTTTTTCGCCTAGCA
XF1388	AAACGCCACATACCTGCTCTCT	ATGCCAGGAAGCCAAGAC
XF1407	GGGAGGTATCCGATGCACAT	TGGAGGCGTTTTAGCTTCGT
XF1408	CGCTGTTGGAACGTGCATT	GCGGTTGATGAGCTGTTTCGT
XF1474	GATCCCGCATGGCTGAAC	GGAATATGGCGACCGTTGAT
XF1490	TGCTATCCAAACACATCAACGAT	TTCTGTGGCAGCCATGTTGT
XF1493	TGCTTACCCACAGTGGTGAA	CCTTCCCATGCAGCAAATG
XF1496	CAGTGGGTCAAAGGCATTGAG	CCATCCGAATCAAGCCAAT
XF1632	AGCGCGAGGAATTTCGAGAA	GCGGAAGCGACCAATGTT
XF1843	TGAGCGCTTGGATTCAAGTCA	TTTTACCGTCACCGATTTTTCC
XF1849	TTGCGCAATCCGCTCTCT	TGGTCGCGGTGTTTGACA
XF1889	TGCGGTAACCTCGTGAGGACTT	CATCGCGCCACTTTCAATTA
XF1945	ACGCGTGGTGGTTTACCTAT	AACCTAGCTTCGGCGAATGA
XF1953	TTTACCGATCACGCGAACAA	TGCCTGCTGGTTACGGCTAT
XF1964	TCCGCGTCAGCTTTTATTG	CGGTGAGTTCTATCGGAACATTG
XF2137	GGCTTCAAGCCATCCGATT	AAATTGCCTTCCAGATCGATGTA
XF2174	CGCTCGCTGATTCCGATTT	TTGATCTTCGCCAGCTCAAA
XF2237	CCAAGAGACTCCAGATATCACGATT	GCGCCGCCAGTGAGTAAAT
XF2344	TGAGCAGGGTAACGAAATTGG	GCCGCCTCAAACCTGAGTCA
XF2360	CACGCCGTCTGCCTTTG	CGCTGCGGTCTTTCTTCAG
XF2361	GCATGCATCTTTTCGGTATTGC	CCAAAGCGTGTCCGATAAGAG
XF2370	CGCAGTGGCTATCTGCAAAA	TCACTGCACCAAGTACGGTAA
XF2398	TACGCTCCCCCGTTGAAG	GGTCACGACGCCACCAA

### 3.8. Obtenção e purificação da proteína recombinante Xf-Fur

#### 3.8.1. Clonagem da sequência codificadora de Fur de *X. fastidiosa*

A sequência codificadora completa de Fur (XF2344) de *X. fastidiosa* (Xf-Fur) foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico purificado da cepa 9a5c utilizando o par oligonucleotídeos abaixo que possibilitam geração de sítios para as enzimas de restrição *KpnI* e *NdeI*:

F NDE1 5' TGAGAAGCATATGGAATTAATGATTTACG

R KPN1 5' CACGGTACCTCCACGACCGCGT

Após digestão com as enzimas *KpnI* e *NdeI*, o produto de PCR obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose e posteriormente eluído da agarose com o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN). O produto de PCR purificado foi então submetido a reação de ligação por 16 horas a 4°C com a enzima T4 DNA ligase (NEB) com o vetor de expressão pET36b (Novagen) previamente linearizado com as mesmas enzimas. A ligação foi dialisada sobre membrana tipo VS de 0,025 µm (Millipore) por 2 horas e 8 µL da ligação foram eletroporados em células de *E. coli* cepa BL21(DE3) (Stratagene). Três colônias foram selecionadas e submetidas à extração de DNA plasmidial para sequenciamento em ambas as fitas para confirmação da autenticidade da construção pET36b-Xf-Fur. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit *BigDye terminator mix v.3.1* (Perkin Elmer), seguindo-se separação e análise no aparelho *ABI377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems), conforme recomendado pelo fabricante.

A clonagem no vetor pET36b resulta na obtenção de uma proteína recombinante com uma cauda de oito histidinas (His-Tag) em sua extremidade C-terminal, que além de auxiliar no monitoramento da expressão da proteína recombinante, facilita sua purificação como descrito a seguir. Esta cauda pode ser removida pelo tratamento da proteína recombinante com enteroquinase.

#### 3.8.2. Expressão da proteína recombinante Xf-Fur

Células de *E. coli* cepa BL21 (DE3) contendo a construção pET36b-Xf-Fur foram crescidas em 5 mL de meio LB [Tripton 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,5% (p/v), pH 7,5] com 1% de glicose e 40 mg/mL de canamicina por aproximadamente 16 horas a 37°C. Uma alíquota dessa cultura foi inoculada em 50 mL de meio LB e crescida à mesma temperatura até atingir  $DO_{600nm} \approx 0,3$  (aproximadamente 2 horas), momento em que foi centrifugada a 3.220xg por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi

ressuspensão em 50 mL de meio LB com 0,3 mM de IPTG e a suspensão foi dividida em quatro frascos, os quais foram incubados por 1, 2 ou 3 horas a 37°C e 16 horas a 20°C. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.220xg por 3 min a 4°C e ressuspensas em 500 uL de tampão de lise A [Tris-HCl 20 mM pH 8,0, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 1 mM, PMSF 1 mM]. As células foram lisadas por sonicação em banho de gelo com 5 pulsos de 15 segundos e a fração solúvel foi obtida recolhendo-se o sobrenadante após centrifugação a 10.000xg por 30 min a 4°C. A quantificação da proteína total nessas preparações foi feita utilizando-se o reagente de Bradford (Bio-Rad). A indução da proteína recombinante foi avaliada pela separação das frações dos extratos bacterianos em SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie R.

### **3.8.3. Purificação de Xf-Fur recombinante por cromatografia de afinidade**

A purificação da proteína recombinante foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de resina Ni<sup>2+</sup>-NTA (Qiagen) por meio de eluições com concentrações crescentes de imidazol. Primeiramente, 200 uL de resina foram equilibrados por inversão em um tubo de microcentrífuga e lavados por 3 vezes com alíquotas de 500 uL de tampão de lise B [Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10% (v/v), PMSF 1 mM] e com 1 alíquota de 1 mL desse mesmo tampão. Em seguida, a resina foi centrifugada a 16.000xg por 1 minuto a temperatura ambiente e, após remoção do tampão, incubada com a fração solúvel (~1 mg de proteína total) do extrato bactérias submetidas a indução como IPTG, por 1 hora em homogenizador (Heavy dutyrotator, Cole Parmer) em baixa velocidade. Após a incubação a resina foi novamente centrifugada por 1 minuto a 16.000xg e o sobrenadante foi recolhido. A fase de eluição foi precedida por lavagens com alíquotas de 750 uL de tampão de lise B por 5 vezes, recolhendo-se o sobrenadante por centrifugação a cada lavagem. A eluição foi feita com porções de 150 uL de tampão de eluição [Tris-HCl 1 M pH 7, NaCl 500 mM, glicerol 10% (v/v), PMSF 100 mM] acrescido de 25, 50, 75, 100, 150 e 300 mM de imidazol, seguindo-se incubação por 15 minutos em gelo, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante. Aliquotas do material eluído foram analisadas por separação em SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie R.

### **3.8.4. Digestão da proteína recombinante com enteroquinase**

A proteína recombinante Xf-Fur, depois de purificada, foi digerida com a enzima enteroquinase (Novagen) para remoção da cauda de histidina em reações contendo 1 U de enteroquinase para cada 30 ou 50 ug de proteína purificada, em reação à temperatura

ambiente por 16 horas. Em seguida, procedemos a purificação da proteína livre da cauda de histidina pela incubação da mistura de reação com a resina Ni<sup>2+</sup>-NTA por 5 minutos e eluição com tampão [Tris-HCl 200 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM].

### 3.8.5. Detecção imunológica de Xf-Fur recombinante

Amostras da proteína recombinante Xf-Fur foram submetidas à separação em SDS-PAGE e em seguida, o gel e uma membrana de nitrocelulose (Osmonics Inc.) foram então incubados por 10 minutos em um tampão de transferência e submetidos a corrente de 50 mA por 1 hora utilizando-se equipamento de transferência [BioRad]. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S 0,1% (p/v) dissolvido em ácido acético 10% (v/v). Em seguida, a membrana foi lavada brevemente com água para remoção do excesso de corante, para checagem da eficiência da transferência realizada e para identificação das bandas relativas aos marcadores de massa molecular. A membrana foi então incubada em TBS 1x [Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM e NaN<sub>3</sub> 0,02% (p/v)] contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação lenta. Após a etapa de bloqueio, a membrana foi incubada por 16 horas na mesma solução, desta vez, contendo o anticorpo anti-Fur-EC, cedido pelo Dr. Michael Vasil (Universidade do Colorado, EUA), na diluição de 1:200. A membrana foi submetida a seis lavagens de 10 minutos cada com TBS 1X sem NaN<sub>3</sub> contendo Tween-20 0,1% (v/v). Após a lavagem, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (GE Healthcare) diluído 1:10.000 em TBS 1X sem NaN<sub>3</sub> contendo Tween-20 0,1% (v/v) e gelatina 1% (p/v). Finalmente, a proteína que reagiu com o anticorpo foi revelada, segundo as instruções do kit *ECL Plus Western blotting detection system* (GE Healthcare), após exposição a filme de Raios-X *Hyperfilm* (GE Healthcare).

## 3.9. Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA)

### 3.9.1 Obtenção dos fragmentos de regiões promotoras contendo Fur boxes de *X. fastidiosa*, *E. coli* e *P. aeruginosa*

Para os ensaios de alteração da mobilidade eletroforética foram amplificados por PCR, fragmentos de DNA de aproximadamente 150 pb utilizando-se os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2 e DNA genômico de *X. fastidiosa*, *E. coli* ou *P. aeruginosa*. Os fragmentos amplificados são relativos à região promotora dos genes *fhuA* de *E. coli*, *pvdS* de *P. aeruginosa* e CDSs XF0009, XF0599, XF2344 e XF16S de *X. fastidiosa*.

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de EMSA.

pfhuAF	CCCTTTCTTTTCATCTGGTTG	pfhuAR	ACGCGCCATTGGTATATCTC
ppvdsF	TCTGAAACGCCGAAGAATTT	ppvdsR	GTGGGGTAAGACCCACACAT
pXF0009F	TCTCATGCTATGGGAAAAGTTAAA	pXF0009R	TGCCAATGGGCTCTATAACA
pXF0599F	CCATTTTGATTACCTGACATCATT	pXF0599R	CAGGGGGATGTAATGTCACC
pXF2344F	CATCGGGTGACTAGGTCGTT	pXF2344R	TAAACAAGAGGTCGCCTTGC
pXF16S-F	GGTCTTGACATCTGCGGAACTT	pXF16S-R	CAGCCATGCAGCACCTGTCT

### 3.9.2. Marcação dos fragmentos de DNA com [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP e purificação

A marcação dos fragmentos de DNA foi feita utilizando-se 20 pmol de DNA, 20 pmol de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP e 1  $\mu$ L da enzima T4 polinucleotídeo quinase (Fermentas) e incubando-se a mistura por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de EDTA 25 mM, seguindo-se extração com clorofórmio. Após a marcação, os fragmentos foram purificados em coluna GFX (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante, sendo a eluição feita com 50  $\mu$ L de água deionizada.

### 3.9.3. Ensaio de interação DNA-proteína

Nos ensaios de interação entre os fragmentos de DNA e a proteína Fur, foram utilizados 30 a 50 nM de DNA e proteína Fur em um gradiente crescente de concentração (0, 10, 25, 50, 100, 500 nM, 1, 5, 10  $\mu$ M), sendo que na concentração de 10  $\mu$ M de proteína, a reação foi feita em duplicata, possibilitando um ensaio na presença de 450 ng de DNA competidor não-radiativo. As reações foram incubadas por 20 minutos a 37°C no tampão de ligação [Bis-Tris 10 mM, pH 7,5, DNA de esperma de salmão 5  $\mu$ g/mL, glicerol, 10% (v/v), MnCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M, BSA 100  $\mu$ g/mL, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM]. A interação foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, por 90 minutos, a 185 V em tampão [Bis-Tris 400 mM, pH 7,5, 2 mM MnCl<sub>2</sub>]. Após a corrida, os géis foram transferidos para uma solução contendo o tampão de eletroforese acrescido de glicerol 3% (v/v) e em seguida secos a 80°C por 40 minutos. O gel foi exposto durante a noite ou por 2 horas ao *Phosphor Screen* (Molecular Dynamics) e este observado no equipamento *Storm* (Molecular Dynamics). Esse procedimento foi adaptado a partir de (de Lorenzo *et al.* 1988; Tao *et al.* 1992). Nesta etapa do trabalho contamos com a colaboração da aluna de iniciação científica Fernanda Lupo que nos auxiliou na padronização destes ensaios.

### 3.10. Análise e comparação de sequências de DNA e proteínas

Para pesquisa de similaridade de sequências de DNA ou de proteínas utilizamos o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990; Altschul *et al.* 1997) em bases públicas de dados tais como o GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o *Xylella fastidiosa* Genome Project (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>) (Simpson *et al.* 2000). Para o alinhamento de sequências de aminoácidos utilizamos o programa ClustalX ou ClustalW (Thompson *et al.* 1994a; Thompson *et al.* 1997) e para análise de domínios protéicos utilizamos principalmente o Pfam e o InterPro (Finn *et al.* 2006; Mulder *et al.* 2007). O planejamento de alguns oligonucleotídeos foi realizado com o programa PRIMER3 (Rozen e Skaletsky 2000).

#### 3.10.1. Busca *in silico* por Fur boxes de *X. fastidiosa*

Inicialmente o conjunto de regiões promotoras de *X. fastidiosa* contendo sequências das posições -350 a +50 pb dos sítios preditos de início de tradução foi recuperado a partir da sequência genômica da cepa 9a5c, disponível em <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>. Um conjunto adicional de 112 Fur boxes caracterizadas em outras bactérias (Tabela S1) foi usado como "*training set*" para buscar Fur boxes putativas no conjunto de regiões promotoras de *X. fastidiosa* utilizando-se o programa CrossMatch ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)), com a exigência de ao menos 10/19 alinhamentos de bases perfeitos. As Fur boxes putativas que mapearam em CDS reguladas negativamente sob excesso de ferro foram selecionadas e as frequências de cada base em cada posição foram determinadas com o programa WebLogo (Crooks *et al.* 2004). As buscas *in silico* foram realizadas em colaboração com o Dr. Helder Nakaya.

### 3.11. Outros procedimentos

Demais procedimentos experimentais utilizados neste trabalho tais como manutenção, cultivo e transformação de bactérias por eletroporação, preparação de plasmídeos em pequena escala e eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) são de uso corrente em nosso laboratório (Gonzalez-Kristeller 2007) e foram adaptados de protocolos descritos nos manuais de laboratório (Sambrook *et al.* 1989; Ausubel 1995).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

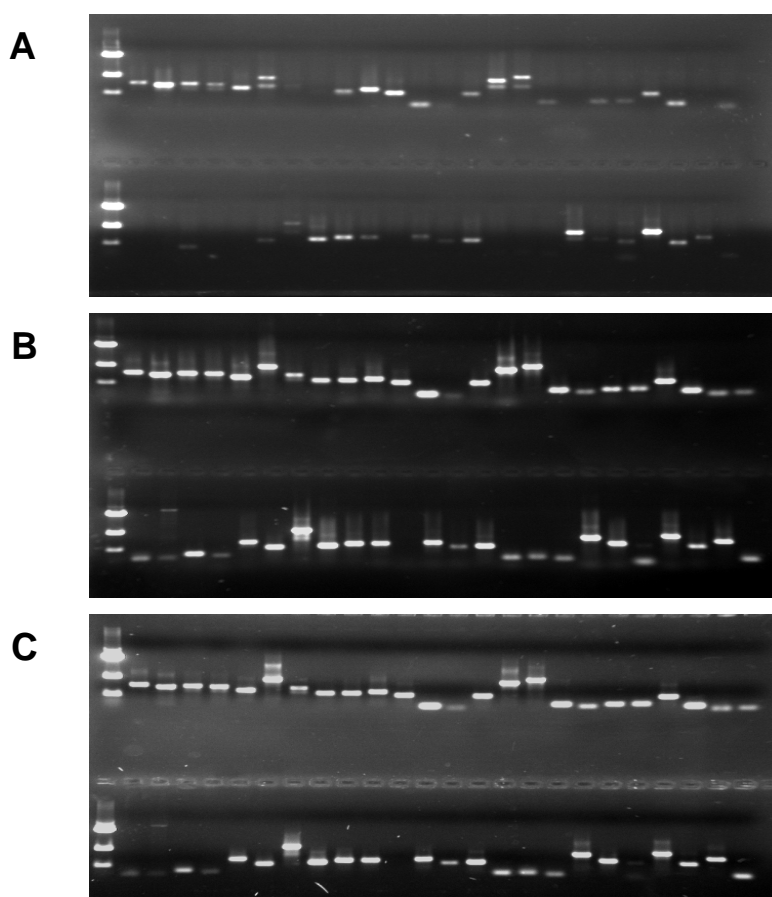
### 4.1. Construção do microarranjo representativo do genoma de *X. fastidiosa* 9a5c

A estratégia para construção do microarranjo de *X. fastidiosa*, cepa 9a5c foi baseada na amplificação de fragmentos específicos para cada uma das CDS anotadas em seu genoma. Para isso foram planejados 2571 pares de oligonucleotídeos CDS-específicos e um primeiro lote de oligonucleotídeos foi sintetizado pela empresa MWG Biotech (Alemanha). Os fragmentos de DNA dupla-fita variando entre 250 e 1000 pb específicos para cada uma das CDS foram obtidos por PCR, em placas de 96 poços, usando DNA genômico ou o plasmídeo pXF51 de *X. fastidiosa* cepa 9a5c como molde. Para obtenção de quantidade adequada de DNA para deposição nas lâminas de vidro, foi necessária uma etapa de re-amplificação antes da etapa de purificação dos fragmentos (Figura 7). Observamos, entretanto, que aproximadamente 15% das reações falharam, foram inespecíficas ou produziram fragmentos de tamanho diferente do esperado. Esse lote inicial de ampliações foi usado na construção da primeira versão do microarranjo de DNA de *X. fastidiosa*, que continha fragmentos de 2264 CDS amplificados satisfatoriamente (~80% de todas as CDS). Esta primeira versão foi utilizada em testes na fase de implantação da metodologia.

Com o intuito de amplificar fragmentos de DNA representativos das CDS que apresentaram resultado insatisfatório no primeiro lote de PCRs, foram sintetizados 355 novos pares de oligonucleotídeos, também em placas de 96 poços, desta vez pela empresa Operon Technologies (Alemanha). O rendimento das ampliações desse lote foi superior ao obtido no primeiro (Figura 8A), sendo que somente 3% não forneceram produtos satisfatórios e não foi necessária a etapa de reamplificação. Os produtos de PCR obtidos com esse segundo lote de oligonucleotídeos foram depositados conjuntamente com os produtos de PCR obtidos com o primeiro lote, constituindo a segunda versão do microarranjo de DNA de *Xylella*. Foi incluído nesta versão o *Lucidea Microarray ScoreCard* (GE Healthcare), que são pontos de referência que permitem testar efeitos de deposição (reprodutibilidade entre as canetas de deposição) e auxiliam a normalização entre os dois canais (verde e vermelho), pois contêm controles negativos e controles de razão 3:1 e 10:1 para os canais. Em resumo, a segunda versão do microarranjo contém fragmentos internos de 2608 CDS de *Xylella*, representando ~92% do total de CDS anotadas por Simpson *et al.* (2000) e foi depositada no banco de dados GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) sob o número de acesso GPL2708.

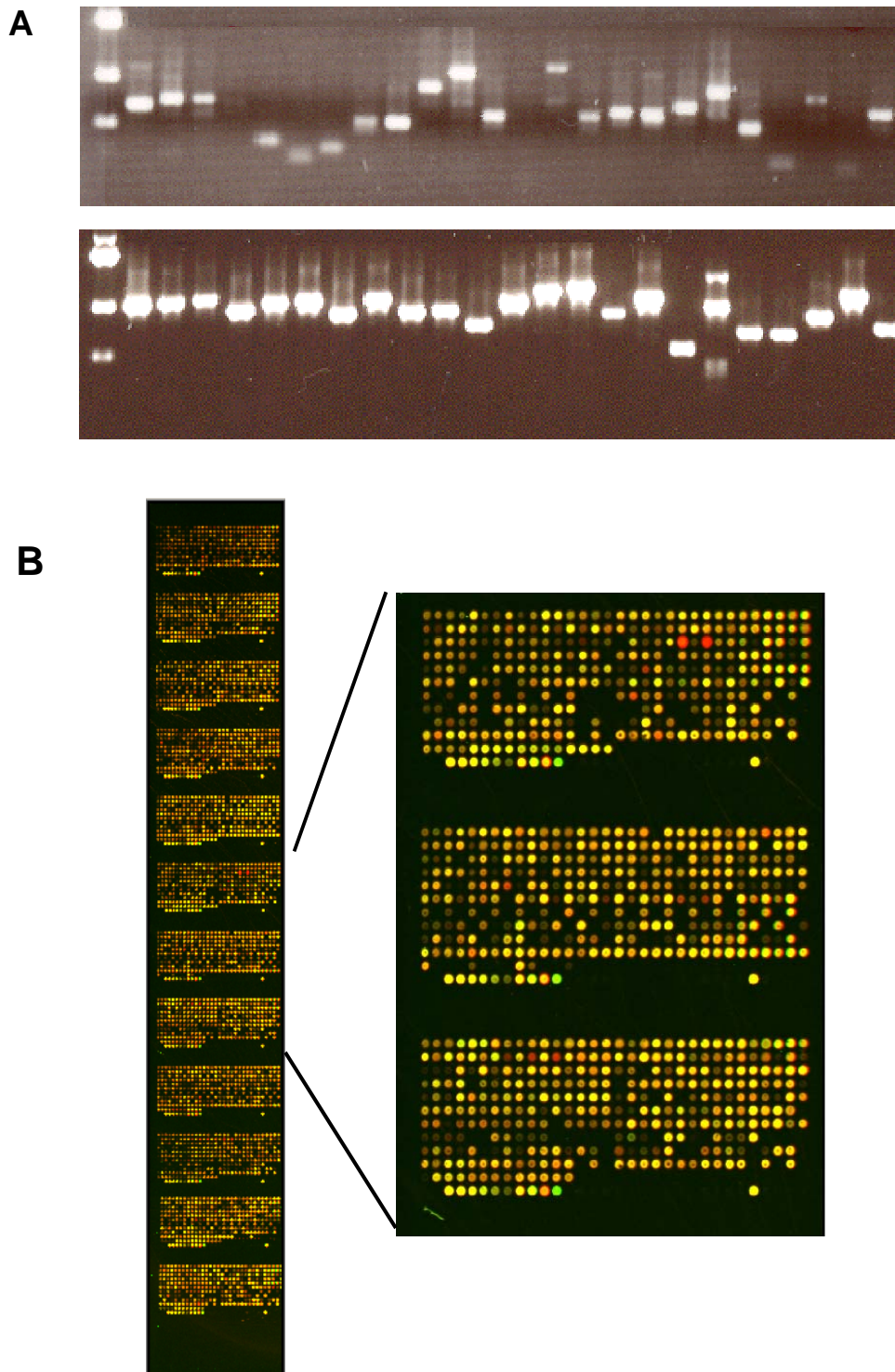
Os fragmentos de algumas CDS de *X. fastidiosa* foram depositados mais de uma vez no microarranjo. Assim, considerando que o conjunto de fragmentos é depositado nas

metades longitudinais da lâmina (*set A* e *set B*) juntamente com o material do *ScoreCard*, o microarranjo de *Xylella* contém 6152 elementos. A qualidade desta versão do microarranjo foi verificada através de hibridizações com DNA da cepa 9a5c (dados não apresentados). Após certificação de sua qualidade, este microarranjo, foi utilizado em experimentos de comparação do genoma das cepas 9a5c e J1a12 de *X. fastidiosa*, a primeira uma cepa virulenta em plantas de citros e tabaco e a segunda, uma cepa incapaz de induzir sintomas típicos de CVC nos ensaios realizados (Koide *et al.* 2004). A Figura 8B mostra uma imagem bicolor de uma das hibridizações realizadas com o microarranjo de *X. fastidiosa*, mesma versão que foi utilizada nos estudos do transcrito de *X. fastidiosa* descritos a seguir.



**Figura 7. Obtenção dos produtos de PCR para construção dos microarranjos de DNA de *Xylella fastidiosa*.** Os produtos de PCR foram obtidos com pares de oligonucleotídeos específicos para cada uma das CDS anotadas no genoma da *X. fastidiosa* cepa 9a5c. A figura mostra exemplos de reações realizadas com o primeiro lote de oligonucleotídeos. Os produtos obtidos na PCR (A) foram diluídos e submetidos à reamplificação (B) e em seguida purificados por filtração (C). Alíquotas de cada uma das amostras nas três etapas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose e os fragmentos de DNA foram visualizados por coloração com brometo de etídio. Os marcadores de tamanho à esquerda correspondem de cima para baixo a 1727, 692 e 267 bp.





**Figura 8. Construção do microarranjo versão 2 de *Xylella fastidiosa*. (A) Comparação do rendimento das reações de PCR realizadas com os dois lotes de oligonucleotídeos. À esquerda, a foto do gel de agarose corado com brometo de etídio dos fragmentos obtidos com o primeiro lote de oligonucleotídeos sintetizados pela MWG, após reamplificação. À direita, fragmentos obtidos com os oligonucleotídeos do segundo lote sintetizados pela Operon. Os marcadores de tamanho à esquerda correspondem de cima para baixo a 1727, 692 e 267 bp. (B) Imagem bicolor do microarranjo representando fragmentos específicos de 2608 CDS de *X. fastidiosa*. O microarranjo de DNA preparado pela deposição dos produtos de PCR purificados foi hibridizado com DNA isolado genômico das cepas 9a5c e J1a12, marcados com Cy3 e Cy5, respectivamente (Koide *et al.*, 2004). Após a hibridização, a lâmina foi analisada no *scanner* e as imagens resultantes da fluorescência obtida para cada um dos fluoróforos, representadas nas cores verde (Cy3) e vermelho (Cy5), foram superpostas. À esquerda está mostrada a porção esquerda do microarranjo (metade da lâmina) com os 12 subarranjos. À direita a figura mostra uma ampliação dos subarranjos 6 a 8.**

## 4.2. Análise do transcrito de *X. fastidiosa* submetida ao cultivo *in vitro* em excesso e carência de ferro

### 4.2.1. Excesso de ferro

A expressão de 2608 CDS (91,6% de todas as 2848 anotadas por Simpson *et al.* (2000)) foi analisada com microarranjos de 6152 elementos, onde cada CDS é representada no mínimo em duplicata. Nossas análises seguem as normas do MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) (Brazma *et al.* 2001), que são recomendações sobre como reportar experimentos com microarranjos para que possam ser reproduzidos por terceiros. Amostras de RNA total obtidas em pelo menos dois experimentos independentes onde células de *X. fastidiosa* cepa 9a5c, com no máximo 20 passagens em cultura, foram coletadas após 15, 60, 240 e 960 minutos da adição de 100  $\mu$ M pirofosfato férrico ao meio de cultura PW. Estes intervalos de tempo foram escolhidos com o intuito de analisarmos tanto a resposta rápida quanto uma resposta tardia, de adaptação, ao excesso de ferro. Os resultados de hibridização aos microarranjos estão sumarizados na Tabela 3. Tabelas detalhadas com a listagem das CDS diferencialmente expressas em cada intervalo de tempo amostrado, bem como as razões de hibridização obtidas estão disponíveis em <http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray/iron>. Esse *web* também contém mapas transcricionais interativos que facilitam a visualização e obtenção de maiores informações a respeito das CDS diferencialmente expressas. Um resumo com as CDS com expressão modulada positiva e negativamente está apresentado como material suplementar (Tabelas S2 e S3). Além disso, o conjunto completo de dados está disponível no banco GEO sob o número de acesso GSE5886.

**Tabela 3.** Resumo das hibridizações aos microarranjos sob excesso de ferro.

CDS representadas no <i>microarray</i>	2608
CDS consideradas como expressas	1328 (100%)
Total de CDS reguladas positivamente	218 (16.4%)
Total de CDS reguladas negativamente	256 (19.3%)
CDS reguladas positivamente após 15 min <sup>a</sup>	69 (5.2%)
CDS reguladas positivamente após 60 min	136 (10.2%)
CDS reguladas positivamente após 240 min	149 (11.2%)
CDS reguladas positivamente após 960 min	135 (10.2%)
CDS reguladas negativamente após 15 min	87 (6.6%)
CDS reguladas negativamente após 60 min	160 (12.1%)
CDS reguladas negativamente após 240 min	158 (11.9%)
CDS reguladas negativamente após 960 min	173 (13%)

<sup>a</sup> Após a adição de 100  $\mu$ M de pirofosfato férrico.

A porcentagem de CDS diferencialmente expressas está na faixa observada em outros estudos similares (Grifantini *et al.* 2003; Tuanyok *et al.* 2005; Maurer *et al.* 2007). A partir dos valores de expressão obtidos nos intervalos de tempo amostrados, foram calculadas razões de expressão em relação ao tempo zero, sendo então construídos perfis de expressão ao longo da série temporal, apenas para as CDS que apresentaram expressão diferencial. Os perfis semelhantes foram agrupados por *K-means clustering* e os grupos formados estão mostrados na Figura 9. Este agrupamento permite a visualização dos grupos regulados positivamente (Figura 9A) e regulados negativamente (Figura 9B), além de realçar CDS com maiores razões de expressão; CDS com perfil crescente ou decrescente ao longo da série temporal ou ainda aquelas com picos de ativação ou repressão.

O nível de expressão de CDS representativas de alguns grupos obtidos no *K-means* foi também avaliado por RT-qPCR. A Figura 10 mostra o perfil obtido para um representante do grupo 4 regulado positivamente e do grupo 5 regulado negativamente, demonstrando boa concordância dos dados de microarranjos de DNA e RT-qPCR, pelo menos para algumas das CDS que testamos (ver adiante).

As CDS diferencialmente expressas em resposta ao excesso de ferro também foram agrupadas de acordo com suas categorias funcionais (Figura 11) de acordo com a anotação reportada em Simpson *et al.* (2000). A regulação negativa de um conjunto considerável de CDS das categorias "Divisão celular", "Metabolismo de proteínas", e "Metabolismo energético", indica que a concentração de 100  $\mu$ M de pirofosfato férrico provoca mudanças em toda a fisiologia de *Xylella*. Essa concentração, no entanto, não afeta a viabilidade de *X. fastidiosa*. Células submetidas a esta concentração por 16 horas e em seguida plaqueadas em meio PW cresceram normalmente (Dra. Andréa C. Fogaça, comunicação pessoal).

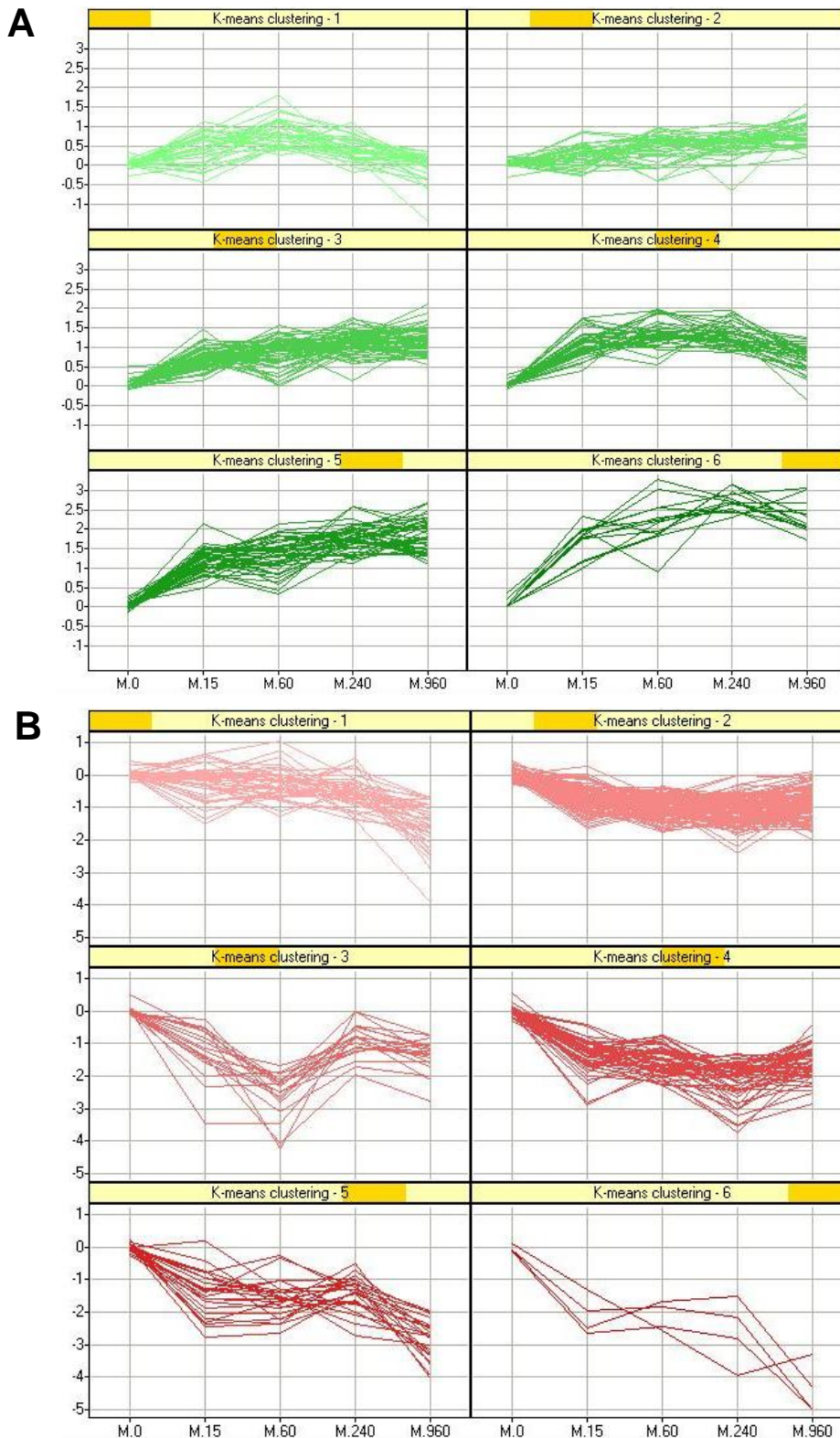
Em termos absolutos, as categorias de "Biosíntese de pequenas moléculas", "Estrutura celular", "Patogenicidade, virulência e adaptação" e "Transporte" também foram consideravelmente afetadas, com 22, 18, 17 e 12 CDS reguladas negativamente, respectivamente e 9, 15, 11 e 6 reguladas positivamente. A categoria "Metabolismo de DNA" também foi destacada na regulação positiva e a maioria de seus membros diferencialmente expressos estão envolvidos no reparo de DNA. Possivelmente as células estejam sofrendo efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio geradas pela reação de Fenton decorrente da alta concentração de ferro no meio (Touati 2000).

A análise dos dados revela que os reguladores transcricionais da família MarR codificados por XF0216 e XF1490 foram mais expressos em alta concentração de ferro. A subunidade sigma H (XF1350) também foi regulada positivamente. Embora classicamente associada à expressão de genes envolvidos em funções metabólicas basais (*housekeeping*), esta subunidade sigma também pode iniciar a transcrição de genes não-

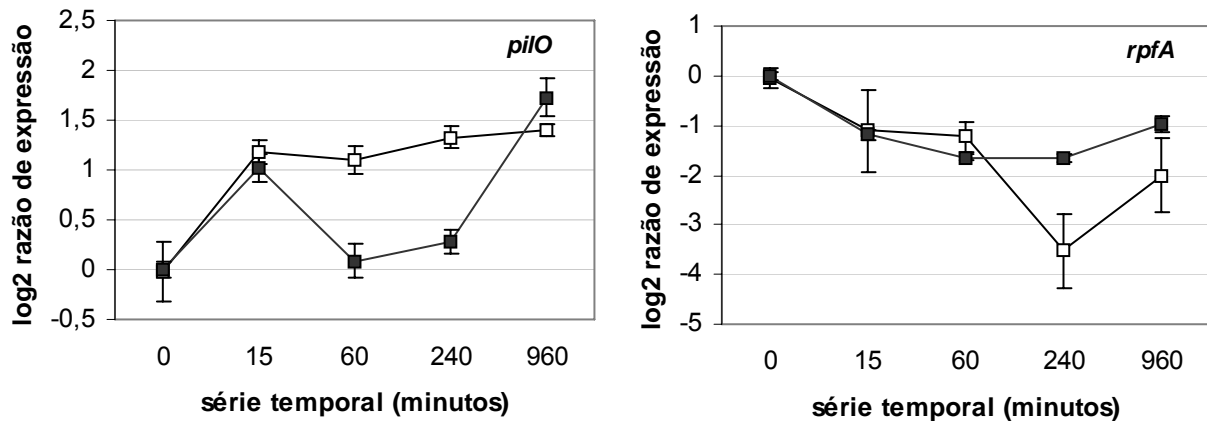
essenciais induzidos em condições ambientais particulares (Reitzer e Schneider 2001). Observamos um fenômeno interessante relacionado à outra subunidade sigma, XF1408 ou sigma 54, cuja expressão foi modulada negativamente nestas condições. A CDS vizinha, XF1407, anotada como um provável inibidor de sua atividade, também foi regulada negativamente na condição de excesso de ferro. Assim, possivelmente a diminuição dos níveis de XF1407 implique em um aumento do nível de transcritos regulados por sigma 54, como por exemplo, componentes de pilus tipo-IV (O'Toole *et al.* 1997; Wolfe *et al.* 2004). Nossos dados suportam essa hipótese, uma vez que um conjunto de CDS para esse tipo de pilus (XF0370-XF0372 e XF1953-XF1955) foi regulado positivamente em alta concentração de ferro (Tabela S2). Ortólogos desses operons, *pilNOP* e *pilJIG*, estão envolvidos na montagem do pilus e em vias quimiosensoriais, respectivamente (Martin *et al.* 1995; Beatson *et al.* 2002). Ambos influenciam a expressão ou atividade do sistema (Mattick 2002).

Como esperado, muitas CDS envolvidas no metabolismo de ferro foram moduladas na condição de excesso de ferro. Como esperado, os receptores de ferro FeoAB (XF0932 e XF0933) não foram induzidos e o receptor XF0599 foi, inclusive, reprimido. Vale destacar que a expressão da CDS XF0599 apresenta um comportamento típico de regulação transcricional por Fur, ou seja, foi reprimida em alta concentração de ferro e desreprimida em baixa concentração. Como será discutido adiante, a região promotora dessa CDS possui duas sequências com alta similaridade com a Fur *box* consenso de *E. coli*. Uma análise mais detalhada da similaridade da sequência de aminoácidos de XF0599 com receptores para compostos férricos mostrou 19% de identidade com receptor de hemina ChuA (44.3 bits de alinhamento) porém 47% de identidade com o receptor de sideróforos do tipo *pyochelin* FptA (694 bits de alinhamento), ambos de *E. coli*. Devemos lembrar, no entanto, que a fonte de ferro no meio complexo PW é hemina, suficiente para o crescimento de *Xylella*.

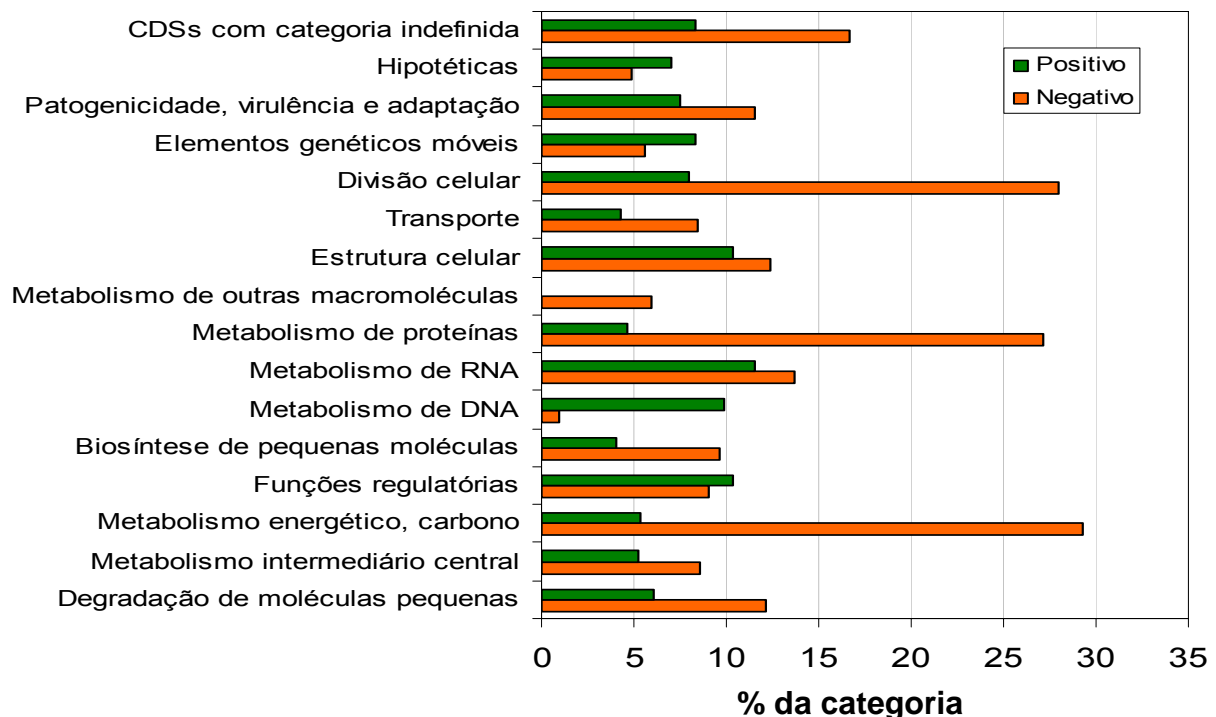
Outras CDS que contém ferro, grupo heme ou centros Fe-S também foram reguladas negativamente como, XF0908, XF1387, XF1388, XF1390 (componentes dos citocromos C e O), XF2306, XF0290, XF1382 e XF2094. A CDS XF2306 codifica para ácido delta-aminolevulínico desidratase, a segunda enzima na via de biossíntese de porfirina e heme. Esta enzima em *Bradyrhizobium japonicum* é essencial para simbiose com soja (Chauhan e O'Brian 1993). Esses autores ainda propõem que ALA (ácido delta-aminolevulínico) seja o único intermediário com heme capaz de ser translocado da planta para o endossimbionte. Ademais, o regulador Irr da família Fur atua na coordenação da biossíntese de heme com a disponibilidade de ferro (Hamza *et al.* 1998).



**Figura 9. Agrupamento por *K-means clustering* de CDS diferencialmente expressas em células de *X. fastidiosa* submetidas a excesso de ferro.** Os grupos (1 a 6) foram gerados de acordo com as razões de expressão observadas para cada CDS após 15, 60, 240 e 960 minutos da adição de 100uM pirofosfato férrico, em relação ao controle (sem pirofosfato férrico). Em todos os gráficos, log<sub>2</sub> das razões de expressão das CDS reguladas positivamente (A) e negativamente (B) é mostrado em função da série temporal, onde cada CDS é representada por uma linha. A ferramenta de *K-means clustering* utilizada nestas análises é parte do programa SpotFire 8.1 (TIBCO Software Inc.).



**Figura 10. Validação por RT-qPCR de perfis de expressão de duas CDS em células de *X. fastidiosa* submetidas a excesso de ferro.** As razões de expressão para as CDS XF0371 (*pilO*) e XF0290 (*rpfA*) foram determinadas, por RT-qPCR ao longo da série temporal após incubação das células com 100 uM de pirofosfato férrico pelos tempos indicados e são relativas a condição controle (células não tratadas). Dados de RT-qPCR (quadrados pretos) foram gerados a partir de triplicatas de uma mistura de duas réplicas biológicas. Para comparação foram incluídos nos gráficos os dados extraídos da análise de microarranjos de DNA (MA, quadrados brancos) obtidos a partir de duplicatas de duas réplicas biológicas. As barras indicam o desvio médio padrão.



**Figura 11. Categorias funcionais das CDS diferencialmente expressas em excesso de ferro.** A proporção de CDS reguladas positiva ou negativamente em alta concentração de ferro (até 16 horas de exposição a 100 uM de pirofosfato férrico) está mostrada em porcentagem do total de CDS em cada categoria. As categorias são baseadas na anotação do genoma de *X. fastidiosa* 9a5c (Simpson *et al.*, 2000) disponível em <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>.

A CDS XF1382 codifica uma proteína hipotética conservada e possui um domínio encontrado na família de proteínas DPS (*DNA-binding protein from starved cells*) que inclui a ferritina. Algumas proteínas DPS se ligam ao DNA não especificamente, protegendo-o de lesões ocasionadas por espécies reativas de oxigênio como radicais hidroxila produzidos pela oxidação de  $Fe^{2+}$  por peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) (Marchler-Bauer e Bryant 2004). A CDS XF2094 codifica para um translocador inserido na membrana interna pertencente à família MexB. Os membros dessa família são capazes de translocar múltiplas drogas e cátions através de um complexo que envolve adicionalmente MexA e OprM (Ocaktan *et al.* 1997). Em *P. aeruginosa* essa proteína é induzida sob condições limitantes de ferro e possivelmente envolvida na secreção do sideróforo *pyoverdine* (Poole *et al.* 1993). Nossos dados mostram que em alta concentração de ferro essa CDS é reprimida.

Os dados de hibridização dos microarranjos indicam que a CDS para bacterioferritina (XF0395) foi regulada negativamente em alta concentração de ferro (Tabela S3). Entretanto, a análise por RT-qPCR mostrou um perfil de expressão contrário, sugerindo que ela seja regulada positivamente sob abundância de ferro (Tabela 5, ver adiante). Não compreendemos essa discrepância entre os dados de expressão para XF0395. Contudo o resultado obtido por RT-qPCR coincide com os resultados observados para *E. coli* e *P. aeruginosa* em que o mRNA da bacterioferritina é induzido frente ao excesso de ferro. Nesses organismos esta regulação envolve os RNAs regulatórios não-codificadores RhyB e PrrF (Masse e Gottesman 2002; Wilderman *et al.* 2004).

Alguns componentes de transportadores do tipo ABC também foram reprimidos (XF0944, XF1067, XF1344, XF1346, XF2141 e XF2144) enquanto outros foram induzidos (XF1220, XF1891, XF2695) na condição de excesso de ferro. Entre os induzidos, está a CDS XF1220 que codifica para a subunidade que liga ATP de um transportador para colicinas do tipo V. Além desta outros componentes envolvidos no sistema de produção e secreção de colicinas tipo V foram regulados positivamente (XF0262, XF0263, XF1216) (Tabela S2). A indução de genes relacionados à síntese de colicinas tipo V em *X. fastidiosa* 9a5c já foi reportada em outros estudos transcricionais envolvendo concentração de glicose e isolados com poucas passagens *in vitro* (de Souza *et al.* 2003; Pashalidis *et al.* 2005). Não detectamos alteração de expressão da CDS XF2586 que codifica para TolC, um transportador supostamente envolvido com a secreção de colicinas tipo V (Reddy *et al.* 2007).

O complexo proteolítico Clp representado pelas CDS XF0381, XF1187 e XF1443 também foi reprimido em alta concentração de ferro. Na presença de ATP esse complexo cliva proteínas em pequenos peptídeos e na ausência, somente peptídeos de no máximo cinco ou seis resíduos são clivados (Katayama-Fujimura *et al.* 1987; Porankiewicz *et al.* 1999). ClpP (XF1187) também pode interagir com as chaperonas GroEL (XF0615 e

XF0616) na degradação de proteínas anormais (Kandror et al. 1994). Além destas e outras CDS para proteínas de choque térmico (XF0991, XF2233, XF2339-XF2341) também foram reguladas negativamente em alta concentração de ferro.

#### 4.2.2. Carência de ferro

O desenho experimental para investigar o perfil transcricional de *X. fastidiosa* exposta a condições de carência de ferro seguiu o mesmo racional dos experimentos para análise do transcrito em resposta ao excesso de ferro, descritos acima. Para gerar a condição de carência de ferro, adicionamos 200  $\mu$ M do quelante de ferro 2,2'-dipiridil ao meio PW, e as células foram coletadas em intervalos de 15, 60, 240 e 960 minutos após a adição. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes para extração de RNA total, seguindo-se hibridização dos microarranjos de DNA de *X. fastidiosa*.

Os resultados de hibridização aos microarranjos estão sumarizados na Tabela 4. Como pode ser observado, a porcentagem de CDS que apresentou expressão diferencial na condição de carência de ferro é semelhante àquela detectada na condição de excesso de ferro (Tabela 3). Tabelas detalhadas com a listagem das CDS diferencialmente expressas em cada intervalo de tempo amostrado, bem como as razões de hibridização obtidas para estes experimentos, também estão disponíveis em <http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray/iron>. Além disso, um resumo com as CDS reguladas positiva e negativamente na condição de carência de ferro está apresentado nas Tabelas suplementares S4 e S5. O conjunto completo de dados está disponível no banco GEO sob o número de acesso GSE5888.

**Tabela 4.** Sumário das hibridizações aos microarranjos sob carência de ferro.

CDS representadas no <i>microarray</i>	2608
CDS consideradas como expressas	1534 (100%)
Total de CDS reguladas positivamente	193 (12.6%)
Total de CDS reguladas negativamente	216 (14.1%)
CDS reguladas positivamente após 15 min <sup>b</sup>	23 (1.5%)
CDS reguladas positivamente após 60 min	125 (8.1%)
CDS reguladas positivamente após 240 min	74 (4.8%)
CDS reguladas positivamente após 960 min	61 (4%)
CDS reguladas negativamente após 15 min	55 (3.9%)
CDS reguladas negativamente após 60 min	134 (8.7%)
CDS reguladas negativamente após 240 min	51 (3.3%)
CDS reguladas negativamente após 960 min	46 (3%)

<sup>b</sup> Após a adição de 200  $\mu$ M de 2,2'-dipiridil.

A porcentagem de CDS diferencialmente expressas está na faixa observada em outros estudos similares (Grifantini *et al.* 2003; Merrell *et al.* 2003; Tuanyok *et al.* 2005;



Maurer *et al.* 2007). De modo similar ao tratamento dos dados provenientes dos experimentos da condição de excesso de ferro, também realizamos o agrupamento por *K-means clustering* das CDS diferencialmente expressas em resposta à carência de ferro ao longo da série temporal. A Figura 12 apresenta o perfil dos grupos obtidos. Interessantemente, a CDS com maior nível de indução de expressão na carência de ferro (grupo 6A) foi XF0932, que codifica um receptor de ferro não complexado similar a FeoB. O grupo 5A contém CDS que também foram induzidas ao longo de toda série temporal, porém em menor intensidade. O grupo 4A evidencia as CDS com indução gradual, mais significativa de uma resposta tardia. Os agrupamentos também representam os vários perfis das CDS com expressão reprimida. Um pico de repressão pode ser observado no grupo 2B. No grupo 3B as CDS foram afetadas já no início da série temporal e em seguida observou-se um retorno aos níveis basais de expressão. Esse resultado mostra a importância de incluir uma série temporal nos estudos de estímulo, uma vez que dependendo do intervalo de tempo escolhido uma fração significativa do estímulo pode passar despercebida.

O perfil de dois dos grupos mostrados na Figura 12 também foi validado por RT-qPCR. A Figura 13 mostra os perfis para um representante do grupo 5 de CDS cuja expressão é aumentada e do grupo 5 de CDS que são negativamente moduladas (XF0933 e XF1407, respectivamente), indicando a concordância dos dados de microarranjos e RT-qPCR para estas CDS.

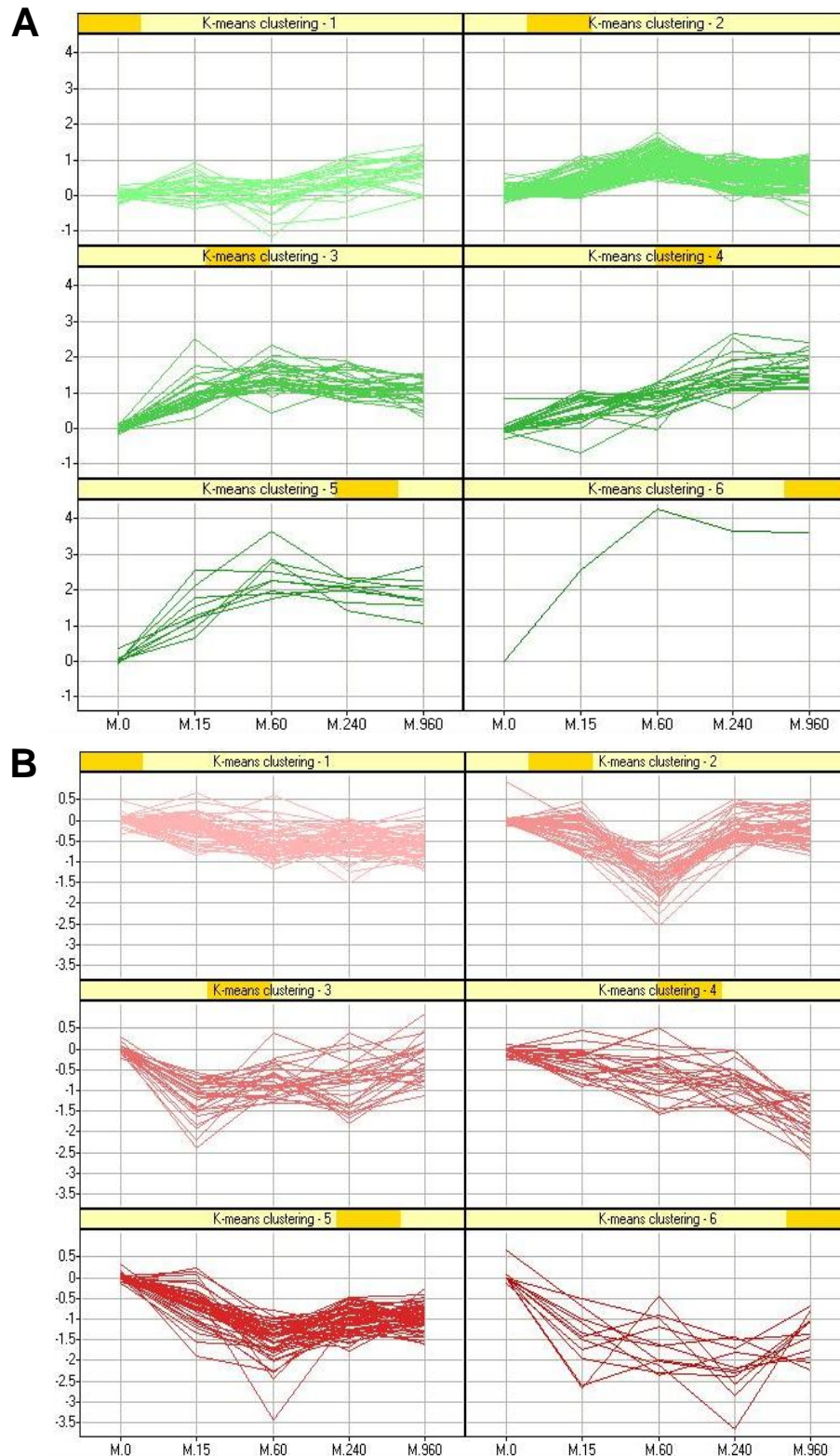
Conforme as categorias funcionais estabelecidas na anotação do genoma da cepa 9a5c, as CDS com expressão diferenciada sob carência de ferro foram agrupadas em busca de funções celulares que possam ser co-reguladas nesta condição (Figura 14). Embora a categoria que contém mais CDS com expressão aumentada em termos relativos seja "Metabolismo de DNA", em termos absolutos nos chamaram atenção as categorias "Biosíntese de pequenas moléculas", "Patogenicidade, virulência e adaptação" e "Transporte" com 15, 13 e 9 representantes cada, respectivamente. Entre as categorias que incluem CDS com regulação negativa destacamos as categorias "Divisão celular", "Estrutura celular", "Metabolismo de proteínas", "Metabolismo de RNA" e "Metabolismo energético", sugerindo que o estresse provocado pelo tratamento utilizado vai além da resposta exclusiva a carência de ferro, resultando em uma diminuição do metabolismo em geral.

A resposta à carência de ferro é perceptível já aos 15 minutos após o tratamento com o quelante tendo em vista o claro aumento do acúmulo de transcritos que codificam receptores de ferro e grupo heme (XF0932, XF0933 e XF0599). Chamou-nos atenção também o aumento da expressão de CDS para precursores de colicinas do tipo V (XF0262 e XF0264) e de CDS para proteínas similares à hemaglutininas (XF2196 e XF2775). Essas últimas foram recentemente descritas como genes de antivirulência em *X. fastidiosa* cepa

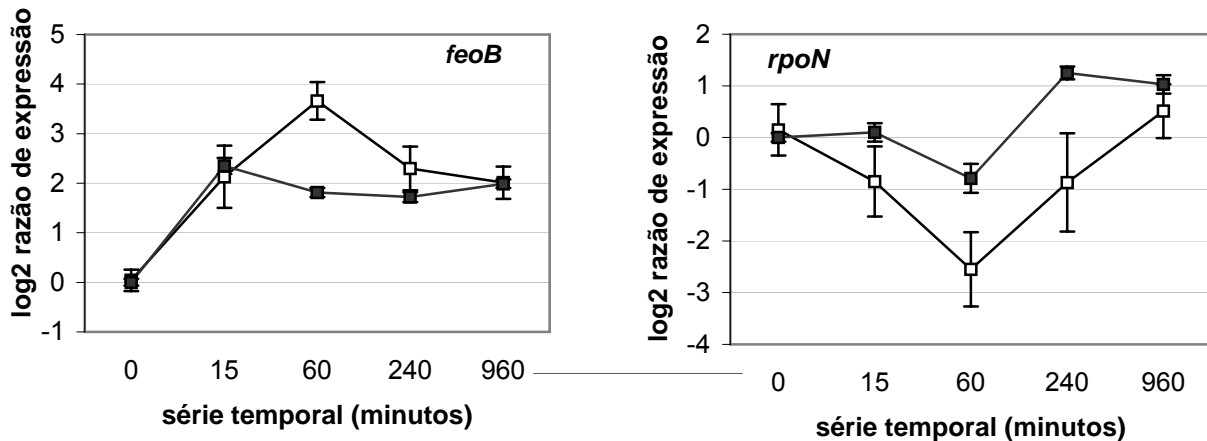
Temecula, por serem importantes para a adesão celular e conseqüentemente reduzirem a taxa de colonização de vasos do xilema (Guilhabert e Kirkpatrick 2005).

Outras CDS, também relacionadas a proteínas de membrana, que responderam positivamente à carência de ferro incluem XF2398, envolvida no transporte de hemolisina, XF1849 e XF2535 componentes sensoriais de sistemas de dois componentes e XF1474 e XF2695, integrantes de transportadores do tipo ABC. A CDS XF1474 possui similaridade com *sufD*, um gene que está envolvido na montagem de grupos Fe-S (Flint 1996). Em *E. coli* e *E. chrysanthemi*, o operon *suf* é importante para a aquisição de ferro e é induzido por estresse oxidativo e carência de ferro (Nachin et al. 2003; Outten et al. 2004).

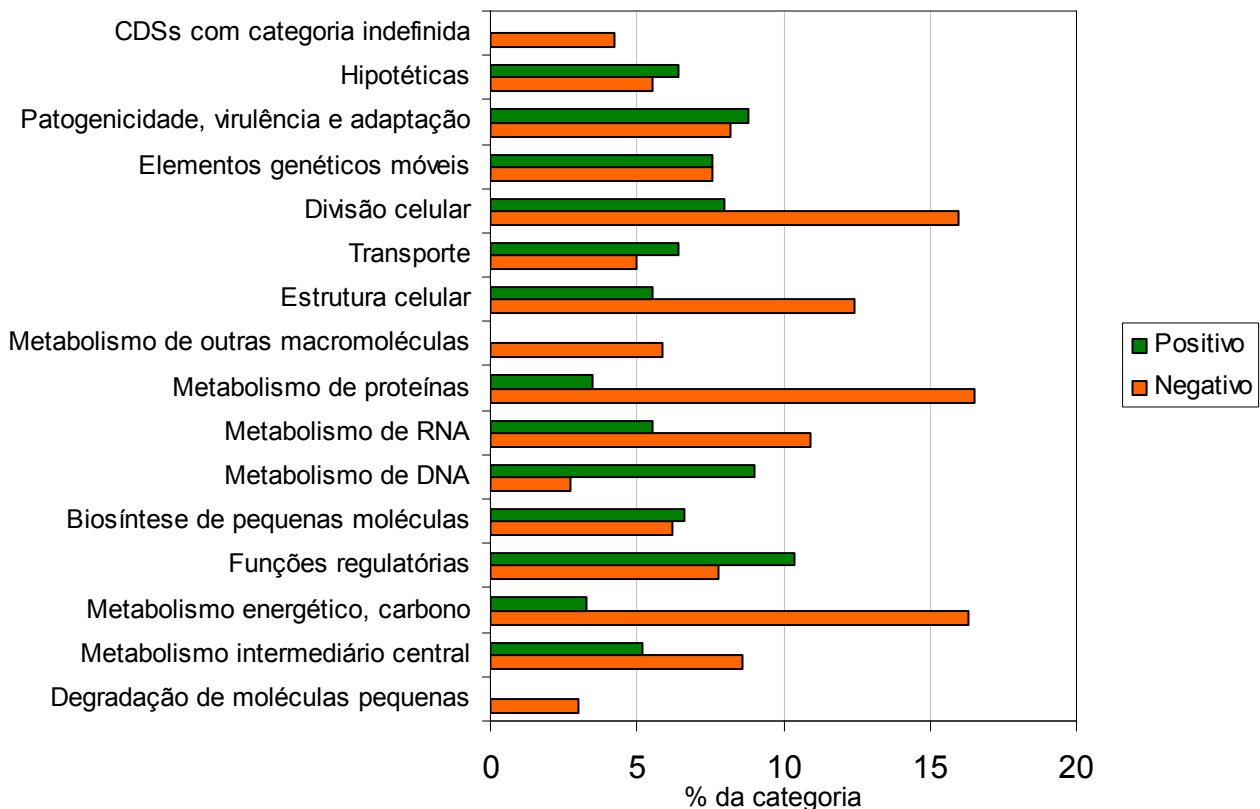
Por outro lado, alguns componentes de transportadores do tipo ABC foram regulados negativamente (XF1346 e XF2144). Além desses, também detectamos XF0872, XF0873, XF1024, XF1123 e XF1811 (proteínas da membrana externa), XF1529 e XF1981 (proteínas de superfície), XF0975 (porina seletiva de polifosfato), XF1801 e XF2261 (transportadores de poli e oligopeptídeos, respectivamente), XF2184 (transglicosilase de membrana) e outras CDS envolvidas na formação do lipolissacarídeo (LPS) da parede celular (XF0151, XF0176, XF1043), todos regulados negativamente.



**Figura 12. Agrupamento por *K-means clustering* de CDS diferencialmente expressas em células de *X. fastidiosa* submetidas a carência de ferro. Os grupos (1 a 6) foram gerados de acordo com as razões de expressão observadas para cada CDS após 15, 60, 240 e 960 minutos da adição do quelante de ferro 2,2'-dipiridill, em relação ao controle (sem o quelante). Em todos os gráficos, log<sub>2</sub> das razões de expressão das CDS reguladas positivamente (A) e negativamente (B) é mostrado em função da série temporal, onde cada CDS é representada por uma linha. A ferramenta de *K-means clustering* utilizada nestas análises é parte do programa SpotFire 8.1 (TIBCO Software Inc.).**



**Figura 13. Validação por RT-qPCR de perfis de expressão de duas CDS em células de *X. fastidiosa* submetidas à carência de ferro.** As razões de expressão para as CDS XF0933 (*feoB*) e XF1407 (*rpoN*) foram determinadas, por RT-qPCR ao longo da série temporal após incubação das células com 200  $\mu$ M de 2,2'-dipiridil pelos tempos indicados e são relativas a condição controle (células não tratadas). Dados de RT-qPCR (quadrados pretos) foram gerados a partir de triplicatas de uma mistura de duas réplicas biológicas. Para comparação foram incluídos nos gráficos os dados extraídos da análise de microarranjos de DNA (MA, quadrados brancos) obtidos a partir de duplicatas de duas réplicas biológicas. As barras indicam o desvio médio padrão.



**Figura 14. Categorias funcionais das CDS diferencialmente expressas em carência de ferro.** A proporção de CDS reguladas positiva ou negativamente em baixa concentração de ferro (até 16 horas de exposição a 200  $\mu$ M de 2,2'-dipiridil) está mostrada em porcentagem do total de CDS em cada categoria. As categorias são baseadas na anotação do genoma de *X. fastidiosa* 9a5c (Simpson *et al.*, 2000) disponível em <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>.

Vários componentes da maquinaria de síntese de ATP também foram reprimidos pela carência de ferro (XF1143, XF1146, XF1147 e XF1148), bem como componentes da cadeia de transporte de elétrons (XF0253 e XF0557). Nossos dados também sugerem que a formação de novos ribossomos funcionais aparentemente tenha sido bastante comprometida, visto que observamos a repressão de cinco componentes da subunidade 30S, oito da 50S e de três fatores de alongação de tradução [XF2628 e XF2640 (EF-Tu), XF2629 (EF-G)]. Além da síntese proteica, a síntese de RNA também parece ter sido prejudicada na condição de carência do ferro, através da repressão de um fator de transcrição XF2165, das subunidades  $\beta$  e  $\beta'$  da RNA polimerase (XF2632 e XF2633) e das subunidades sigma H, sigma 54 e sua proteína de modulação (XF2239, XF1408 e XF1407). Uma recente re-anotação das subunidades sigma de *Xylella* indica que na verdade XF2239 corresponde a sigma E e não a sigma H como está anotada atualmente (Dra. Marilis Marques, comunicação pessoal).

Outro grupo interessante de CDS com expressão diferencial inclui XF1843, XF1848 e XF1849. Juntas elas compõem um sistema de dois componentes possivelmente envolvido na resposta ao nitrogênio e regulado pela proteína P-II (codificado por XF1843). A proteína NtrC (XF1848), quando fosforilada, funciona como um ativador da subunidade sigma 54 da RNA polimerase (Reitzer e Schneider 2001). Em outras bactérias, já foi demonstrado que entre as diversas funções celulares influenciadas por sigma 54, encontra-se a biogênese de pilus tipo-IV (Boyle-Vavra et al. 1993; Carrick et al. 1997; Wolfe et al. 2004; Parker et al. 2006). A holoenzima RNA polimerase contendo a subunidade sigma 54 é capaz de formar um complexo fechado com suas sequências-alvo de DNA na ausência da proteína ativadora NtrC, o chamado bloqueio estérico (De Reuse e Taha 1997). Interessantemente, nossos dados indicam que a carência de ferro reduz os níveis dos transcritos para XF0029, XF0033, XF0082, XF0083, XF0373, XF1632, XF1953 e XF2544, todos envolvidos na biogênese de pilus tipo-IV, além de XF1517 e XF1520 (componentes do sistema de secreção tipo II) e da subunidade sigma 54, citada previamente. Já foi mostrado que, em *Xylella* e em *Xanthomonas*, os genes xpsEL (XF1517 e XF1520) são modulados por fatores ambientais tais como presença de extratos de plantas e seus produtos interagem pelo menos *in vitro* (Lee et al. 2001; Coltri e Rosato 2005).

Outro aspecto que merece destaque é a maior abundância de transcritos que codificam três reguladores transcricionais nas células submetidas a carência de ferro. Entre eles encontra-se um representante da família LuxR/UhpA (XF0972). O domínio LuxR é encontrado em muitos reguladores que são fosforilados por membros sensores de sistemas de dois componentes e estão envolvidos em uma série de funções biológicas como fixação de nitrogênio em *Rhizobium meliloti*, bioluminescência em *Vibrio fischeri* e esporulação em *Bacillus subtilis* (Kahn e Ditta 1991; Sacco et al. 1995; Sitnikov et al. 1995). Reguladores

com domínio LuxR também estão envolvidos em *quorum-sensing* mediado por derivados de homoserina lactonas (Welch et al. 2000). Recentemente foi demonstrado que ExpR, ortólogo de LuxR, em *Erwinia carotovora* ativa a transcrição de uma proteína que atua como regulador global pós-transcricional de RNA nesta bactéria (Cui et al. 2005). Outros dois reguladores com expressão ativada na carência de ferro pertencem a família MarR (XF0216 e XF1354). Interessantemente, o nível do transcrito de XF0216 também aumentou na condição de excesso de ferro, possivelmente indicando uma regulação devido a condições adversas de crescimento ao invés de um efeito direto da concentração de ferro. Membros da família MarR estão distribuídos amplamente e aparentemente regulam funções diversas como síntese de fatores de virulência em *S. typhimurium*, antibióticos e exoenzimas em *E. carotovora*, agentes antimicrobianos em *Serratia marcescens* e adesinas e fatores de invasão em *Yersinia pseudotuberculosis* (Libby et al. 1994; Thomson et al. 1997; Nagel et al. 2001). Um estudo do stimulon de ferro em *N. gonorrhoeae* em meio definido sugere a participação de outros reguladores transcricionais além de Fur no stimulon de ferro, explicando, assim, a ausência de sequências Fur *box* em parte dos genes modulados por ferro (Ducey et al. 2005). Se esse é o caso em *Xylella*, bem como as funções precisas dos reguladores que detectamos são questões que permanecem.

A carência de ferro aparentemente influencia também os reservatórios intracelulares de ferro encontrados em *Xylella*. CDS para bacterioferritina (XF0395) e para proteínas que contêm grupos de ferro-enxofre (XF0253, XF0287, XF0290, XF0557, XF1073, XF1472, XF1889) foram reguladas negativamente. Este efeito também ocorre em *H. pylori*, onde *pfr* (que codifica para ferritina) é reprimido em baixas concentrações de ferro (Bereswill et al. 2000). Em *E. coli* e *P. aeruginosa*, o ncRNA RhyB está envolvido na regulação negativa de bacterioferritina e em *E. coli*, o mRNA para aconitase A (XF0290 em *Xylella*) também é regulado por RhyB (Masse e Gottesman 2002; Wilderman et al. 2004). A modulação de CDS que contêm ferro ou centros de ferro-enxofre é uma maneira de regular a concentração intracelular de ferro livre, complementando a absorção extracelular para manter a homeostase (Touati 2000).

Outras funções celulares afetadas pela carência de ferro incluem a diminuição da abundância de transcritos para proteínas de choque térmico (XF0616, XF1484, XF2339, XF2340 e XF2341), síntese de goma (XF2360), formação do septo de divisão celular (XF0286, XF1320, XF1321 e XF1322), ciclo do ácido tricarboxílico (XF1535), ribonucleases (XF1125 e XF2158) e exodeoxiribonucleases (XF0164 e XF2022). Por outro lado, as ribonucleases codificadas por XF1041 e XF2781 tiveram sua expressão aumentada pela carência de ferro. Além dessas, nos chamou atenção o conjunto de onze CDS de elementos genéticos móveis (XF1875, XF2053, XF2127, XFa0005, XFa0008, XFa0012, XFa0036,

XFa0039, XFa0042, XFa0059, XFa0060), cuja expressão também foi reduzida na carência de ferro.

#### 4.2.3. Validação da expressão diferencial através de RT-qPCR

Para avaliar com mais precisão a expressão diferencial evidenciada através dos dados de microarranjos de *X. fastidiosa* exposta a excesso ou carência de ferro, selecionamos também outras CDS para a análise por RT-qPCR quantitativa. Os resultados obtidos para este conjunto de CDS estão apresentados na Tabela 5. No total 44 CDS foram analisadas, ou ao longo de uma série temporal ou em um tempo específico, em uma ou ambas as concentrações de ferro (total de 75 testes). Os conjuntos de dados obtidos por microarranjos de DNA e por RT-qPCR para estas 44 CDS apresentam uma correlação de Pearson de 0,77 (Figura 15). Uma correlação superior é comum em estudos comparativos entre essas técnicas (Jenson *et al.* 2003; Ducey *et al.* 2005; Yuan *et al.* 2005), no entanto, existem exemplos de taxas de validação menores que a encontrada por nós (Etienne *et al.* 2004; Liew e Chow 2006).

Interessantemente, a CDS para o regulador transcricional da família ArsR (XF0767), que segundo os dados de microarranjos, não havia sido classificada entre genes diferencialmente expressos, apresentou aumento no nível de seu transcrito de aproximadamente 2,5 vezes em resposta a carência de ferro na análise por RT-qPCR. Esse regulador foi recentemente rebatizado de BigR, por estar associado ao crescimento do biofilme em *X. fastidiosa* (Barbosa e Benedetti 2007). Os autores chamam atenção para o fato desse regulador estar restrito até o momento a apenas quatro espécies bacterianas associadas à plantas. Não observamos em nosso trabalho uma relação clara entre a disponibilidade de ferro e formação de biofilme.

Outras CDS como XF0262 e XF0320 mostraram apenas uma sutil diferença de expressão após 60 minutos, com razões inferiores às observadas nos dados de microarranjo (dados não mostrados). Nesta comparação também detectamos outro possível falso positivo (XF0975) (dados não mostrados) evidenciando o caráter exploratório da técnica de microarranjos, além de possivelmente CDS reguladas por fatores independentes de ferro.

Poucos estudos realizaram uma comparação com número grande de CDS como feito por nós. A maioria dos trabalhos envolve a validação de apenas algumas CDS, escolhidas entre as CDS com razões de expressão elevadas, o que obviamente eleva enormemente a chance de validação. Um possível motivo para os casos de discordância entre as metodologias seja que selecionamos, para avaliação por RT-qPCR, CDS com sinal fraco nos experimentos de microarranjos, próximo ao limite aceito nas nossas metodologias de

análise. Para essas CDS, o ruído nos valores de razão é maior do que para CDS com pontos mais intensos. As CDS XF1496, XF2137 e XF2237 (receptores de ferro) e XF2360 (biossíntese de goma) são exemplos dessa situação. No outro extremo, CDS com sinais muito intensos, perto da saturação, também podem apresentar valores de razão enviesados devido à saturação de apenas um canal de fluorescência. Neste caso os valores de razão de expressão serão menores que os reais, o que poderia aumentar o desvio padrão entre as réplicas. Possivelmente pelos motivos expostos acima, algumas CDS que não haviam sido consideradas como reguladas por ferro pelos dados de microarranjos, passam a ser pelos dados de RT-qPCR, como é o caso de XF0263, XF0767, XF1496 e XF2137 (precursor de colicina tipo V e regulador transcricional, além dos receptores de ferro já citados, respectivamente).

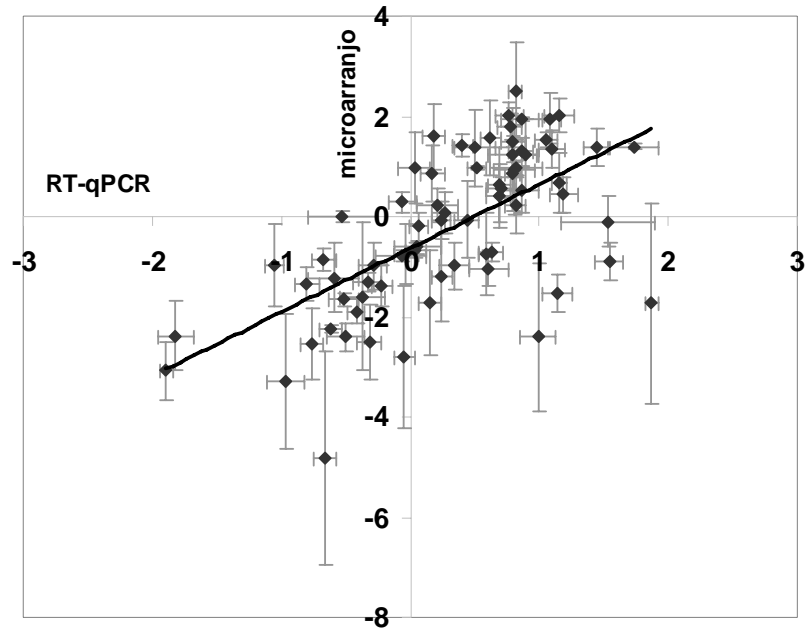
O caso de discrepância que mais nos intrigou foi a CDS XF0395 que codifica para bacterioferritina. Esta CDS havia sido considerada como regulada negativamente em alta concentração de ferro pelos dados de microarranjo. Porém quando analisada por RT-qPCR ela foi considerada como regulada positivamente (Tabela 5), o oposto do observado nos dados de microarranjo. Embora suas réplicas nos dados de microarranjo apresentem sinais intensos, consideramos pouco provável que o efeito da possível saturação de um dos canais de fluorescência seja capaz de gerar um artefato tão grande. Como os oligonucleotídeos planejados para os experimentos de RT-qPCR são de alta especificidade (temperatura de anelamento de 60°C no qPCR) e a análise é feita dentro da faixa linear de amplificação, confiamos mais nestes dados. Além disso, os dados do perfil de expressão da CDS que codifica a bacterioferritina obtidos por RT-qPCR estão de acordo com estudos feitos em *E. coli* e *P. aeruginosa*, nos quais o RNA regulatório RyhB está envolvido na regulação positiva de transcritos em condições de alta concentração de ferro (Masse e Gottesman 2002; Wilderman et al. 2004).



**Tabela 5.** Níveis de transcritos de CDS selecionadas analisados por RT-qPCR.

CDS	Produto	Gene	PF	DP	CDS	Produto	Gene	PF	DP
<b>Captação, uso e armazenagem de ferro</b>					<b>Pilus e fimbria</b>				
XF0932	ferrous iron transport protein	<i>feoA</i>	↔	↑	XF0029	pre-pilin leader sequence	<i>pilV</i>	↔	↓
XF0933	ferrous iron transport protein	<i>feoB</i>	↔	↑	XF0033	PilE protein	<i>pilE</i>	↔	↓
XF0599	TonB-dependent receptor for iron	<i>fptA</i>	↓	↑	XF1632	twitching motility protein	<i>pilU</i>	↓	↓
XF0395	bacterioferritin	<i>bfr</i>	↑	↑	XF1633	twitching motility protein	<i>pilT</i>	↓	↔
XF0550	TonB-dependent receptor for iron <sup>a</sup>		↓	↔	XF1953	pilus biogenesis protein	<i>pilJ</i>	↑	↓
XF1073	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	<i>sdhB</i>	↔	↓	XF1954	pilus biogenesis protein	<i>pilI</i>	↑	↔
XF1889	ferredoxin-NADP reductase	<i>fpr</i>	↓	↓	XF1955	pilus protein	<i>pilG</i>	↑	↔
XF0557	electron transfer protein azurin I	<i>az1</i>	↓	↓	XF2544	pilus biogenesis protein	<i>pilB</i>	↓	↓
XF0253	electron transfer flavoprotein alpha subunit	<i>etfA</i>	↓	↓	XF2545	two-component system, regulatory protein	<i>pilR</i>	↔	↓
XF0287	regulator of pathogenicity factors	<i>rpfB</i>	↓	↓	XF0370	fimbrial assembly membrane protein	<i>pilN</i>	↑	↔
XF2094	multidrug-efflux transporter	<i>mexB</i>	↓	↓	XF0371	fimbrial assembly membrane protein	<i>pilO</i>	↑	↔
XF0908	cytochrome C oxidoreductase	<i>petA</i>	↓	↔	XF0372	fimbrial assembly protein	<i>pilP</i>	↑	↔
XF1387	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit IV	<i>cyoD</i>	↓	↔	XF0082	chaperone protein precursor	<i>fimC</i>	↓	↓
XF1388	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit III	<i>cyoC</i>	↓	↔	XF0083	fimbrial subunit precursor	<i>fimA</i>	↓	↓
XF1390	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit II	<i>cyoA</i>	↓	↔	XF1407	sigma-54 modulation protein	<i>rpoX</i>	↓	↓
XF2306	delta-aminolevulinic acid dehydratase	<i>hemB</i>	↓	↔	XF1408	RNA polymerase sigma-54 factor	<i>rpoN</i>	↓	↓
XF2344	ferric uptake regulator	<i>fur</i>	↔	↔	XF1843	nitrogen regulatory protein P-II	<i>glnB</i>	↑	↑
XF1382	conserved hypothetical protein (DPS domain)		↓	↔	XF1848	two-component system, regulatory protein	<i>ntrC</i>	↔	↑
<b>Divisão celular</b>					XF1849	two-component system, sensor protein	<i>ntrB</i>	↔	↑
XF1320	cell division topological specificity factor	<i>minC</i>	↓	↓	<b>Bacteriocinas similares à colicina tipo V</b>				
XF1321	septum site-determining protein	<i>minD</i>	↓	↓	XF0261	colicin immunity protein <sup>a</sup>	<i>cvi</i>	↑	↑
XF1322	cell division inhibitor	<i>minE</i>	↓	↓	XF0262	colicin V precursor	<i>cvaC</i>	↑	↑
XF0800	cell division protein	<i>ftsZ</i>	↓	↔	XF0263	colicin V precursor	<i>cvaC</i>	↑	↔
XF0801	cell division protein	<i>ftsA</i>	↓	↔	XF0264	colicin V precursor <sup>a</sup>	<i>cvaC</i>	↔	↑
XF0802	cell division protein	<i>ftsQ</i>	↓	↔	XF1216	colicin V secretion protein	<i>cvaA</i>	↑	↔
<b>Metabolismo energético</b>					XF1220	colicin V secretion ABC transporter	<i>cvaB</i>	↑	↔
XF1535	citrate synthase	<i>gltA</i>	↓	↓	<b>Reguladores transcricionais</b>				
XF2596	isocitrate dehydrogenase	<i>icd</i>	↓	↓	XF0216	(MarR family)	<i>prsX</i>	↑	↑
XF0942	malate:quinone oxidoreductase	<i>yojH</i>	↓	↓	XF0972	(LuxR/UhpA family)	<i>glpR</i>	↔	↑
XF2547	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	<i>sucC</i>	↓	↓	XF1354	(MarR family)	<i>yybA</i>	↔	↑
XF2548	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	<i>sucD</i>	↓	↔	XF1490	(MarR/EmrR family)		↑	↔
XF0290	aconitase	<i>rpfA</i>	↓	↓					

As setas indicam regulação positiva (↑), negativa (↓) ou não-alterada (↔) no nível dos transcritos. PF corresponde à situação de excesso de ferro (100 μM pirofosfato férrico) e DP à carência de ferro (200 μM 2,2'-dipyridyl). <sup>a</sup> atualmente anotadas como "hipotéticas conservadas" no banco do genoma de *Xylella*. As categorizações não seguem necessariamente as utilizadas por Simpson *et al.* 2000. Para evitar imprecisão na tradução para a língua portuguesa mantivemos o nome dos produtos gênicos na língua inglesa.



**Figura 15. Correlação geral entre dados de microarranjo e RT-qPCR.** Razões de expressão obtidas dos dados de microarranjo foram comparadas com dados de RT-qPCR. Para uma representação linear de CDS reguladas positiva ou negativamente, estão plotados  $\log_2$  das razões de expressão.

### **4.3. Identificação de Fur *boxes* e caracterização funcional da proteína Fur de *X. fastidiosa***

Com o objetivo de identificar a provável consenso para sequência Fur *box* de *X. fastidiosa* e conseqüentemente a fração do *stimulon* de ferro modulada diretamente pela proteína Fur, buscamos no genoma de *X. fastidiosa* cepa 9a5c sequências Fur *box* putativas. Também avaliamos a capacidade da proteína recombinante Fur de *X. fastidiosa* (Xf-Fur) de reconhecer *in vitro* sequências Fur *boxes*, através de ensaios de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA).

#### **4.3.1. Busca *in silico* de sequências Fur *box* no genoma de *X. fastidiosa***

Quando inicialmente buscamos pela Fur *box* consenso de *E. coli* no genoma de *X. fastidiosa*, utilizando o algoritmo CrossMatch, observamos que essa sequência e suas variantes não eram frequentes (dados não apresentados). Assim, consideramos as hipóteses de que o regulon de Fur fosse pequeno (algumas dezenas de CDS) ou que a sequência consenso reconhecida pela Fur de *X. fastidiosa* fosse diferente da de *E. coli*. Partindo da segunda hipótese, ampliamos nossa estratégia de busca, construindo um banco de sequências de 112 sequências sabidamente reconhecidas por Fur de outras bactérias e recuperadas da literatura (Tabela S1). Este conjunto foi utilizado na pesquisa por sequências similares em regiões promotoras das CDS de *X. fastidiosa*, utilizando-se o algoritmo CrossMatch e exigindo-se um pareamento mínimo de 10 das 19 bases. Com esta abordagem, encontramos 653 sequências Fur *box* putativas em *X. fastidiosa* (dados não mostrados).

Como etapa seguinte, combinamos os dados de microarranjo com esse conjunto de Fur *boxes* putativas, uma vez que é esperado que uma CDS que seja regulada por Fur terá o nível de seus transcritos reduzidos quando em presença de alta concentração de ferro. Das 256 CDS reguladas negativamente em alta concentração de ferro, 49 concentram 61 sequências Fur *box* putativas identificadas na análise informática, sugerindo que Fur não seja o único regulador transcricional modulado por ferro (pelo menos não diretamente). A Tabela 6 lista as 49 CDS e suas respectivas Fur *boxes* putativas. Nossas análises também sugerem que algumas CDS reguladas por Fur possuem mais de um sítio de ligação. Isto pode ser interpretado como diferentes níveis de regulação, como observado em outros estudos (Le Cam *et al.* 1994; Escolar *et al.* 2000; Baichoo e Helmann 2002).

**Tabela 6.** Fur boxes putativas de *X. fastidiosa* utilizadas para obter o consenso.

Gene ID	Consenso encontrado	PP <sup>a</sup>	IC <sup>b</sup>	Sequência Fur box putativa
XF0083	AATTGAAATTATTAT	14	-222	GAATTGAAATTATTATTAA
XF0083	ATGATTTTCA	10	1	TTTTCATGATTTTCATAAT
XF0256	ATGTTGCTGTTGATA	13	-252	TTACGATGTTGCTGTTGAT
XF0283	CTTCAAATAATCA	12	-70	TTCAAATAATCACGACAA
XF0290	GTAATTGACGAT	11	22	TGTAATTGACGATGGGTGG
XF0434	ATGATTTTCA	10	-182	CCGATGATTTTCACATACC
XF0457	GTTGTTGATTAT	11	-155	GGAGCAGGTTGTTGATTAT
XF0457	AATGATTCTGAATA	12	-328	CCAATGATTCTGAATAATC
XF0565	ATTAACAATCAGTA	12	-210	AGATTAACAATCAGTAGAG
XF0599	GTTAAAGAGTATCAATAGC	13	-130	TTAAAGAGTATCAATAGCT
XF0599	GAGAATGATTTTCAATAGC	15	-114	GGAGAATGATTTTCAATAG
XF0624	TTACTGGTGGTGGTATGA	13	-242	TGTTACTGGTGGTGGTATGAA
XF0625	TTACTGGTGGTGGTATGA	13	19	TGTTACTGGTGGTGGTATGAA
XF0816	TGGCAATCAATATC	12	-301	GCGGTGGCAATCAATATCA
XF0816	ACAATCATT	10	-344	CCCAAAAACAATCATTAGG
XF0872	TAATTGGTGGTGGTATGA	14	-323	CGTAATTGGTGGTGGTATGAG
XF0898	TAATGTCGTTTTTGGT	13	-108	CGGTAATGTCGTTTTTGGT
XF0898	TGATGTTGATGA	11	-220	TCTCCTTGATGTTGATGAG
XF0898	TTGTTGATGA	10	-25	TCCTCTCCTTGTTGATGAG
XF0912	ATGTTGCTGACGAT	12	-238	TGCTGATGTTGCTGACGAT
XF0944	TTAATGTTTTTGG	11	-230	ACTTAATGTTTTTGGCCGA
XF0961	ATGATTTTCTAGAG	12	-110	GCGATGATTTTCTAGAGTT
XF1024	AATGAGTATCAA	11	0	CGAATGAGTATCAACAAAC
XF1025	TGTTGTGGATGA	11	-163	ACATTGTTGTGGATGACCT
XF1137	CTTTTTAATAAT	11	-122	GCTTTTTAATAATGTGGGT
XF1162	TTTAAGATTTTAGATGAT	14	-282	TTTTAAGATTTTAGATGAT
XF1175	AATTATTTTGAATA	12	-1	TAAATTATTTTGAATACAA
XF1213	AATCATTTC	11	-234	TCAATCATTTCACAAAG
XF1265	ATTGGCAATCAT	11	-343	AGCGATTGGCAATCATCGT
XF1265	ATTTTGTGGATG	11	-109	ATCACATTTTGTGGATGGT
XF1297	GAGTATCAAAAGC	12	-139	CGTAGGAGTATCAAAAGCA
XF1443	TTGAATGTTGTT	11	-259	TGAATGTTGTTTGTGGT
XF1448	GTAATTGATAAT	11	-235	TAATTGATAATAAATGACA
XF1530	TAAAGGGAATCAACAGC	14	-126	ATAAAGGGAATCAACAGCA
XF1531	TAATGTGGTTGA	11	34	TCGTAATGTGGTTGAAAT
XF1531	TTGATGTTGTTG	11	-52	TCTTGATGTTGTTGCAATA
XF1549	AATAATCATT	10	-46	CGCTGAATAATCATTACTT
XF1589	GACAATCATT	10	-1	TATCCAAGACAATCATTCA
XF1707	TAATTAACAATAAT	12	-27	TAATTAACAATAATGGAGG
XF1708	GTAATCGACAAT	11	-33	GGTAATCGACAATTGAAAC
XF1803	AATTATTTTCAA	11	-128	TTAATTATTTTCAACTTAT
XF1827	TGTTTTTCAATA	11	-116	TTGATGTGTTTTTCAATAA
XF1834	ATGTTGATTATGAT	12	-256	CAGATGTTGATTATGATGC
XF1834	TAATCTTGTGGTG	12	-56	TTCTAATCTTGTGGTGTG
XF1859	GTAATTCATTATCATT	14	-310	AGTAATTCATTATCATTAG
XF1859	ATGTTGTGGTTGAT	12	-16	TAATGATGTTGTGGTTGAT
XF1859	AAAGACGATCAATA	12	-112	GAAAAGACGATCAATAAAA
XF1970	ATGCTTTTCAATA	12	1	TTTATGCTTTTCAATAATG
XF1981	GTTAAGGAGTAT	11	-15	TTAAGGAGTATTGTTATGC
XF1987	TAAAAATCATT	11	-345	ATCCAGTAAAAATCATTCA
XF2094	TGTTGTTGGTGGTAT	12	-299	ACTGTGTTGTTGGTGGTATGG
XF2165	ATGTTGTTGGTGA	12	-250	ATTATGTTGTTGGTGGTATGG

XF2339	ATGTGGTTGATG	11	-183	ACGATGTGGTTGATGCTGA
XF2360	TTTACTGTTGATGAT	13	-28	TACTGTTGATGATTTTCC
XF2424	TTTAATGTCGTT	11	-27	TTTAATGTCGTTATTGTG
XF2438	CTCTAAAATACTCATTTTC	15	-164	TCTAAAATACTCATTTTCA
XF2544	TGTTGTTGATG	11	-11	CAGGTGTTGTTGATGCCTA
XF2596	TTTATGTTGCTGATG	13	-292	TTTATGTTGCTGATGTGGA
XF2638	TATAGTAATCAT	11	-94	TGAGTATAGTAATCATGAC
XF2638	ATGTTGTTGATG	11	14	GGTATGTTGTTGATGCCTA
XFa0002	ATAATAATCA	10	-208	ACCATAATAATCAGCTACA

**Tabela 6.** continuação. <sup>a</sup> PP, número de bases com pareamentos perfeitos. <sup>b</sup> IC, início do consenso, a partir do provável início de tradução.

A partir dessas análises selecionamos algumas Fur *boxes* para verificação experimental de sua capacidade de ligar Fur recombinante em ensaios de EMSA, como será descrito adiante. Através da análise integrada dos resultados de microarranjos, busca *in silico* por sequências Fur *box* e ensaios de EMSA propomos um consenso para Fur *box* de *X. fastidiosa*, como descrito adiante.

A busca por sequências regulatórias em um genoma é um dos grandes desafios na biologia computacional e genômica funcional. O problema de identificação dessas sequências traduz-se em buscar padrões comuns a um conjunto de sequências de DNA, e vários algoritmos têm sido empregados na resolução desse problema (Feng e Doolittle 1987; Lawrence e Reilly 1990; Lawrence *et al.* 1993; Thompson *et al.* 1994b; Eddy *et al.* 1995; Mount 2001). Esses métodos identificam um conjunto de sítios alinhados a partir de múltiplas sequências e um sítio modelo correspondente denominado "motivo". Esses algoritmos podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro emprega a abordagem "uma espécie, vários genes", onde promotores de genes sabidamente co-regulados são analisados (Pevzner e Sze 2000). O segundo método, mais utilizado, pode ser chamado de "um gene, várias espécies" ou *phylogenetic footprinting*. Este é baseado na conservação de mecanismos regulatórios entre as espécies (McCue *et al.* 2001) ou entre parálogos (Gumucio *et al.* 1992). Há ainda iniciativas que mesclam as duas abordagens ("vários genes, várias espécies") (Wang e Stormo 2003; Siddharthan *et al.* 2005). Nossa abordagem seguiu esta última tendência.

#### 4.3.2. Obtenção de Xf-Fur recombinante

Visando obter a proteína Fur de *Xylella* em quantidade e pureza suficiente para realizar ensaios *in vitro* de interação com sequências de DNA, optamos por produzir a

proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidinas. Estas permitem uma purificação rápida e eficiente por cromatografia de afinidade.

Antes da clonagem, fizemos uma análise da sequência proteica codificada pelo gene *fur* de *Xylella* (XF2344), disponível no endereço eletrônico <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>. Chamou-nos atenção o fato da sequência de aminoácidos descrita para Fur de *X. fastidiosa* cepa 9a5c (Simpson et al., 2000) conter um segmento N-terminal de 28 aminoácidos, não encontrado nas sequências de Fur de três outras cepas de *Xylella*, de *P.aeruginosa* e *E. coli* e ainda nas sequências que compõem o domínio COG para a proteína Fur, todas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Presumimos, portanto, que a sequência adicional na CDS XF2344 é proveniente de um erro de anotação e optamos por trabalhar com a sequência mais próxima daquela encontrada em outras bactérias, omitindo os primeiros 28 aminoácidos. Dessa forma a sequência utilizada no planejamento da clonagem de Xf-Fur possui 408 nucleotídeos e 136 aminoácidos (Figura 16).

O par de oligonucleotídeos para clonagem de Xf-Fur foi planejado para introduzir os sítios de restrição para *Nde* I na extremidade 5' e para *Kpn* I na extremidade 3' do fragmento de DNA que seria gerado por PCR a partir do DNA genômico da cepa 9a5c de *X. fastidiosa*. O produto da PCR obtido foi digerido com as enzimas *Nde* I e *Kpn* I e ligado ao vetor pET36b. A autenticidade da construção pET36b-Xf-Fur foi confirmada através de sequenciamento de DNA de três clones independentes, e a sequência obtida (Figura 16) mostrou que a clonagem foi bem sucedida e que o segmento de DNA clonado não contém mutações.

A construção pET36b-Xf-Fur foi então utilizada para expressão de Xf-Fur recombinante em *E. coli*. Diferentes condições de indução com IPTG foram testadas visando otimizar a quantidade de proteína recombinante solúvel obtida (dados não mostrados). Verificamos que condição mais eficiente foi indução a 37°C por 3 horas, sendo esta a condição escolhida para indução de Xf-Fur recombinante em maior escala (Figura 17). Como pode ser constatado na Figura 17 (canaleta 1), a adição de glicose 1% ao meio de cultura antes da adição de IPTG impediu completamente a expressão basal da proteína recombinante. A proteína recombinante foi recuperada na fração solúvel do extrato bacteriano (Figura 17, canaleta 2). Xf-Fur recombinante exibe em SDS-PAGE uma massa molecular de ~20 kDa, a qual está de acordo com a massa molecular calculada para Xf-Fur (15.724,78 Da) acrescida do segmento C-terminal adicional conferido pelo vetor (4.483,69 Da). Este segmento C-terminal contém além do sítio de clivagem de enteroquinase, a cauda de oito histidinas. Além disso, a Xf-Fur recombinante reage, ainda que fracamente, com o anticorpo anti-Fur-EC, preparado contra Fur de *E. coli* (Prince et al. 1991) (dados não apresentados).

A proteína Xf-Fur recombinante recuperada na fração solúvel do lisado bacteriano foi purificada em cromatografia de afinidade em resina Ni<sup>2+</sup>-NTA. Como mostrado na Figura 17, a proteína foi totalmente adsorvida na resina e níveis adequados de eluição foram atingidos com 150mM de imidazol. Avaliamos que a cromatografia em Ni<sup>2+</sup>-NTA da fração solúvel de bactérias induzidas a 37°C resultou em um grau de purificação satisfatório e que a quantidade de Xf-Fur obtida (aproximadamente 400 ug) seria suficiente para avaliar sua capacidade de ligar-se a fragmentos de DNA contendo sequências *Fur box*.

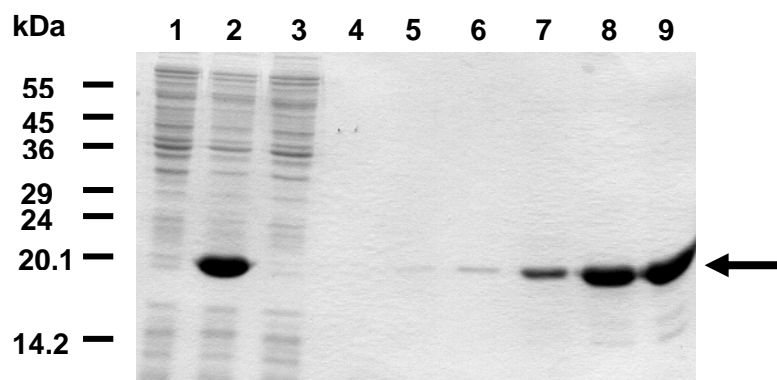
Algumas tentativas de eliminar a cauda de histidinas de Xf-Fur recombinante, utilizando-se a enzima enteroquinase, foram realizadas (dados não apresentados). Entretanto, o rendimento obtido foi insatisfatório e a quantidade de Xf-Fur recombinante livre da cauda de histidina obtida foi insuficiente para realização dos ensaios de interação proteína-DNA.

```

1   acccagccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatctccccatcggg
61  gatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccacgat
121 gcgtccggcgtagaggatcgagatcgatctcgatcccgcgaaattaatacgaactcactat
181 aggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaaataattttgtttaactttaagaa
241 ggagatatacatatggaattaaatgatttacgtaaagttggtttgaaggtgacgcacccg
      M E L N D L R K V G L K V T H P
301 cggatccgatccctcgaactgctcgaacagtcacagtagtgaacatcaccttagtgctgaa
      R I R I L E L L E Q S S S E H H L S A E
361 gacatttacccggcagttgcttgagcagggtaacgaaattggccttgccacagtgatcgg
      D I Y R Q L L E Q G N E I G L A T V Y R
421 gtgctgactcagtttgaggcggcaggattagtgcttaagcataatttcgagagcggggcag
      V L T Q F E A A G L V L K H N F E S G Q
481 gcgggtctacgagatcgaccgtggcgacatcacgatcacatgggtggatgtcgataccgg
      A V Y E I D R G G H H D H M V D V D T G
541 aagatcattgagtttcacaacgaggagattgagttggttgcagcgcagcattgctgctgaa
      K I I E F H N E E I E L L Q R S I A A E
601 cgcggttatgagttggaagaacactcgtttggctcttgtagcgtacgtaaaaaacgcgggtcgt
      R G Y E L E E H S L V L Y V R K K R G R
661 ggaggtaccgatgacgacgacaagagcccggttctcctcaaccatggcgatatacggat
      G G T D D D K S P G F S S T M A I S D
721 ccgaattcgagctccgtcgacaagcttgccggccgcactcgagcaccaccaccaccaccac
      P N S S S V D K L A A A L E H H H H H H
801 caccactaattgattaatacctaggctgctaaacaaagcccgaaaggaagctgagttggc
      H H -

```

**Figura 16. Clonagem da sequência codificadora de *fur* de *X. fastidiosa* no vetor de expressão pET36b.** Sequência parcial da construção pET36b-Xf-fur obtida com o sequenciamento de três clones independentes. A sequência do promotor T7 que é parte do vetor está sublinhada. Os sítios de restrição das enzimas *Nde* I e *Kpn* I gerados pelos oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação de Xf-Fur estão em negrito (**catatg** e **ggtacc**, respectivamente). A proteína recombinante Xf-Fur é acrescida de um segmento C-terminal que inclui o sítio de clivagem com enteroquinase, que está sublinhado, e cauda de oito histidinas que está em negrito e itálico. O códon de terminação da tradução está marcado por um hífen. Sequência proteica deduzida utilizando-se o programa *ExPASy Translate Tool* (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>).



**Figura 17. Purificação de Xf-Fur recombinante por cromatografia de afinidade.** A cultura de bactérias BL21(DE3) transformada com a construção pET36b-Xf-Fur crescida a 37°C, por uma noite, foi diluída 1:50 vezes em meio fresco contendo glicose 1% e incubada a 37°C até  $DO_{600nm} = 0,3$ . Neste momento as células foram transferidas para meio fresco (sem adição de glicose 1%), seguindo-se adição de IPTG para concentração final de 0,3 mM. Uma fração da cultura separada como controle sem adição de IPTG (não induzida). Após 3 horas, as células foram coletadas e após lise por sonicação a fração solúvel foi separada por centrifugação. Alíquotas correspondentes a 10  $\mu$ g da fração solúvel da cultura não induzida com IPTG (canaleta 1) e 10  $\mu$ g da fração solúvel da cultura induzida com IPTG (canaleta 2) foram analisadas por SDS-PAGE 10% e coloração com Coomassie Blue. A fração solúvel do lisado de bactérias induzidas foi purificada por cromatografia de afinidade em  $Ni^{+2}$ -NTA-agarose. A canaleta 3 mostra a fração não adsorvida à resina e as canaletas 4 a 9 referem-se às eluições com 25, 50, 75, 100, 150 e 300 mM de imidazol, respectivamente. As amostras também foram separadas em gel de SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue. A seta indica o polipeptídeo de aproximadamente 20 kDa que corresponde a Xf-Fur recombinante.

#### 4.3.3. Análise da interação Xf-Fur com Fur boxes através de EMSA

Como uma abordagem visando à caracterização funcional de Xf-Fur recombinante realizamos ensaios de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA) para avaliar sua capacidade de se ligar *in vitro* a regiões promotoras contendo Fur boxes putativas de *X.fastidiosa* e também Fur boxes já caracterizadas em *E. coli* e *P.aeruginosa*.

Escolhemos para estes ensaios a região promotora de *fhuA* de *E. coli* e de *pvdS*, de *P. aeruginosa*. O primeiro gene codifica para um receptor para sideróforos da classe dos hidroxamatos, enquanto o segundo codifica um fator sigma envolvido com o controle da biossíntese do sideróforo *pyoverdine* (Berish *et al.* 1993; Ochsner *et al.* 1995). Além dessas escolhemos região promotora da CDS XF0599 (*fptA*, anotada como receptor de compostos férricos em *X.fastidiosa*) e que apresentou diminuição de expressão em alta concentração de ferro segundo dados de microarranjos de DNA e de RT-qPCR (Tabelas S3 e 5). Além disso a região promotora de XF0599 apresenta duas Fur boxes putativas, segundo nossas análises informáticas (Tabela 6).

Também selecionamos a região promotora da CDS que codifica Fur (XF2344) dado que este gene é auto-regulado em alguns organismos (Thomas e Sparling 1994; Barton *et al.* 1996; Loprasert *et al.* 1999; Sala *et al.* 2003). Entretanto, nossos dados de microarranjos e RT-qPCR mostraram que o transcrito de *fur* não é diferencialmente expresso em carência



ou excesso de ferro. Além disso, a região promotora de XF2344 não apresenta *Fur box* conservada.

Outra região promotora que selecionamos foi da CDS XF0009 (*tonB*) que é regulada por *Fur* em alguns organismos (Bjarnason *et al.* 2003). Segundo nossas análises a região promotora de XF0009 também não apresenta sequências como similaridade a *Fur boxes*. Esta CDS também não é diferencialmente expressa em excesso ou carência de ferro. Como controle negativo dos ensaios, escolhemos um segmento interno de RNA ribossômico 16S (XF16S), o qual não tem nenhuma similaridade a *Fur boxes* conhecidas.

Os segmentos de DNA correspondentes às regiões promotoras mencionadas acima foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico, purificados e radioativamente marcados antes de serem utilizados nos ensaios de interação com Xf-*Fur* recombinante.

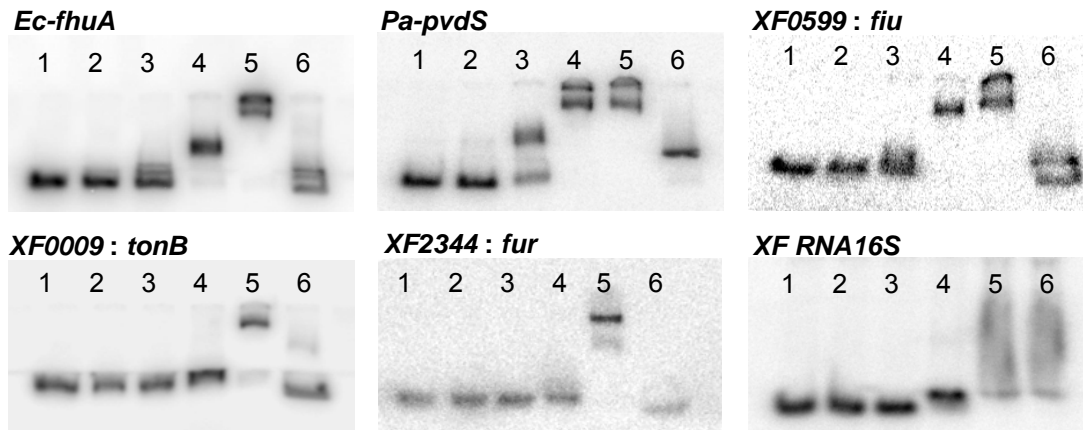
Como mostrado na Figura 18, Xf-*Fur* recombinante é capaz de reconhecer *Fur boxes* dos promotores de *fhuA* de *E. coli* e de *pvdS*, de *P. aeruginosa*. Este resultado era esperado uma vez que o domínio de ligação ao DNA YRVLTQ da *Fur* de *P. aeruginosa* proposto por Coy e Neilands (1991) e revisado posteriormente (Gonzalez de Peredo *et al.* 2001; Pohl *et al.* 2003) é conservado na proteína de *X. fastidiosa* (Figura 5). Além disso, como esperado o segmento interno do RNA 16S, utilizado como controle negativo, não interagiu com Xf-*Fur*, validando assim os ensaios realizados.

Os ensaios de interação proteína-DNA também mostraram que ao menos uma ou ambas *Fur boxes* putativa existentes na região promotora CDS XF0599 é reconhecida por Xf-*Fur* recombinante (Figura 18). Estes resultados indicam fortemente que a resposta transcricional observada para esta CDS, isto é, regulação positiva em carência de ferro e regulação negativa na situação de excesso de ferro (Tabelas S3, S4 e 5) seja controlada por *Fur in vivo*.

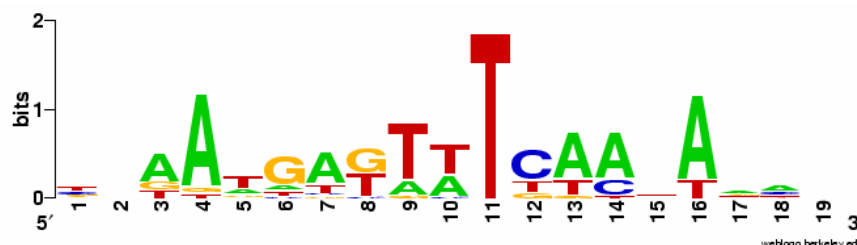
Os demais fragmentos de DNA testados, correspondentes às regiões promotoras de XF0009 e XF2344 apresentaram interação Xf-*Fur* somente quando a concentração mais alta de proteína foi utilizada, o que era esperado pela ausência de sequências *Fur box* conservadas em suas regiões promotoras, segundo os resultados da busca *in silico* que realizamos. Possivelmente estas interações sejam inespecíficas. Como já mencionado, em alguns organismos a expressão de *fur* é alto-regulada, entretanto este não parece ser o caso em *X. fastidiosa*. Já foi descrito que na bactéria Gram-negativa *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a expressão de *fur* também não é auto-regulada (Quatrini *et al.* 2005).

Em resumo, concluímos que das três regiões promotoras de *X. fastidiosa* avaliadas por EMSA, apenas a região de XF0599 contem uma *Fur box* capaz de ligar Xf-*Fur* recombinante. Utilizamos esta sequência juntamente com as sequências *Fur boxes* de *fhuA* de *E. coli* e de *pvdS*, de *P. aeruginosa*, que também ligaram Xf-*Fur*, para extrair das 61 *Fur boxes* putativas de *X. fastidiosa* (Tabela 6) um conjunto de 34 que foram utilizadas para

formar um consenso para a Fur *box* de *X.fastidiosa*. O consenso obtido está apresentado na Figura 19. Destacamos que a sequência 5' NNNAATGAGTTTCAANANN possui identidade à Fur *box* consenso de *E. coli* em 9 posições e ainda possui 6 posições indefinidas, indicando a possibilidade do reconhecimento de diversas sequências. Diferentemente de *E. coli*, a Fur *box* de *X. fastidiosa* não é tão conservada entre os genes do hipotético regulon de Fur.



**Figura 18. Ensaio de interação de Xf-Fur recombinante com Fur *boxes*.** Os ensaios de alteração de mobilidade eletroforética com Xf-Fur recombinante e regiões promotoras de CDS selecionadas foram realizados pela incubação de concentrações crescentes de Xf-Fur recombinante purificada com 30 nM do fragmento de DNA previamente marcado com  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP. As canaletas 1 a 5 correspondem, respectivamente, a 0, 10 nM, 100 nM, 1 uM e 10 uM de Xf-Fur. A especificidade da reação foi avaliada pela incubação do fragmento de DNA radiativo com 10 uM de Xf-Fur na presença de DNA competidor frio, em excesso de 20 vezes (canaleta 6). As CDS de *E. coli* (Ec), *P. aeruginosa* (Pa) e de *X. fastidiosa* cujas regiões promotoras foram utilizadas estão indicadas no canto superior esquerdo da imagem de cada gel. Um segmento interno do RNA 16S de *X. fastidiosa* (XF16S) foi utilizado como controle negativo. A interação de Xf-Fur com o DNA radiativo foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, seguindo-se exposição a *Phosphor Screen* (Molecular Dynamics) e detecção das bandas no equipamento *Storm* (Molecular Dynamics).



**Figura 19. Fur *box* consenso de *Xylella*.** Alinhamento de 36 sequências Fur *box* putativas presentes em CDS reguladas negativamente em alta concentração de ferro. A figura mostra a frequência relativa das bases em cada posição. Construída com o programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

## 5. CONCLUSÃO

A análise de transcritomas é capaz de fornecer uma riqueza de informações especialmente valiosas para o estudo de diversos organismos, em particular aqueles para os quais ferramentas de genética molecular ainda estão em desenvolvimento. Abordagens genômicas comumente revelam aspectos previamente desconhecidos sobre a biologia de organismos. De fato este foi o caso que verificamos neste estudo sobre a resposta transcricional de *X. fastidiosa* cepa 9a5c frente ao cultivo na presença de excesso ou carência de ferro. Muitas das CDS que, de acordo com dados da literatura, esperávamos serem reguladas por ferro não foram significativamente afetadas pelas condições testadas. Entre estas citamos as toxinas do tipo RTX similares a hemolisinas (Guilhabert e Kirkpatrick 2005; Reddy *et al.* 2007). Já foi demonstrado que em algumas bactérias os genes que codificam toxinas similares a essas compõem o stimulon do ferro (Hirono *et al.* 1997; Wooldridge *et al.* 2005; Balashova *et al.* 2006).

Por outro lado, nossos dados revelaram que o stimulon de ferro em *Xylella* vai além da regulação de sistemas de captação e armazenagem do metal e abrange componentes relacionados a produção de pilus tipo-IV e colicinas do tipo V. Relatos anteriores já mostraram a influência dos níveis intracelulares de ferro sobre a expressão dessas toxinas em *E. coli* (Gilson *et al.* 1987; Chehade e Braun 1988; Boyer e Tai 1998). Porém, acreditamos ser essa a primeira descrição da relação entre ferro e esses fatores de virulência em fitopatógenos. Especulamos que a detecção do metal pela bactéria possa ser importante nos estágios iniciais da colonização da planta para ativar sistemas que permitam uma movimentação pelos vasos do xilema e também para aumentar sua capacidade competitiva frente aos microorganismos endofíticos. Embora não se tenha ainda sido confirmado se *X. fastidiosa* produz seu próprio sideróforo (Simpson *et al.* 2000; Bhattacharyya *et al.* 2002a; Van Sluys *et al.* 2002; Silva-Stenico *et al.* 2005), vale ressaltar que ela dispõe do sistema de captação de sideróforos, cujos componentes mostraram expressão aumentada face a carência de ferro. Uma possibilidade a ser investigada é se *X. fastidiosa* utiliza sideróforos (e/ou hemóforos) produzidos pelas bactérias endofíticas e/ou pelos próprios hospedeiros ou vetores (Crosa *et al.* 2004).

A análise do transcritoma de *X. fastidiosa* em resposta a variação na concentração de ferro sugere que o metabolismo deste metal parece não estar diretamente relacionado a a formação do biofilme. Não observamos alteração significativa nos níveis de expressão dos genes que codificam para a biossíntese e secreção de goma na situação de carência de ferro, que possivelmente é encontrada por *Xylella* no hospedeiro. De fato, segundo a hipótese corrente para formação de biofilme por *X. fastidiosa* as células inicialmente se multiplicam e aderem umas as outras e às superfícies dos vasos do xilema e só então

passam a produzir goma e adesinas similares à hemaglutininas para a maturação do biofilme, quando ocorre o entupimento dos vasos e os sintomas tornam-se evidentes (Leite *et al.* 2002; Scarpari *et al.* 2003; Osiro *et al.* 2004; Guilhabert e Kirkpatrick 2005; Souza *et al.* 2006).

Estudos adicionais são necessários para uma compreensão mais detalhada da regulação dos possíveis mecanismos destacados acima, bem como para avaliar a importância de cada na sobrevivência de *Xylella* no hospedeiro e no vetor. Em um trabalho recente (Li *et al.* 2007), a importância do pilus tipo-IV para a mobilidade de *Xylella* dentro dos vasos do hospedeiro foi definitivamente confirmada. Como já mencionado, nossos resultados indicam que a concentração de ferro influencia a abundância de transcritos relacionados à formação do pilus tipo-IV, principalmente aqueles ligados à montagem do pilus e ao sistema sensorial envolvido em seu funcionamento. Entretanto, aparentemente a regulação destes genes não está sob a regulação direta de Fur, dado que não há evidência de Fur *boxes* em seus respectivos promotores. Possivelmente, outros reguladores transcricionais modulados por ferro participem no controle destes genes. Outra possibilidade que não podemos excluir é que a regulação independente de Fur contemple mecanismos de regulação pós-transcricionais. Abordagens que integram análises de transcritomas e proteomas, tais como as utilizadas no estudo conduzido por Wan e colaboradores (2004) serão importantes para esclarecer estes aspectos que demonstram a habilidade das bactérias em adaptar seu regulon de Fur de acordo com seu nicho ecológico.

Assim como verificado para outros patógenos, nossos dados demonstram que a variação na concentração de ferro provoca mudanças drásticas no metabolismo e na arquitetura celular. Detectamos mudanças nos níveis de transcritos envolvidos em componentes enzimáticos e estruturais, totalizando aproximadamente 23% do genoma ou 685 CDS. Entre estas, 285 estão anotadas como CDS hipotéticas ou hipotéticas conservadas. Utilizando ferramentas como BlastX e Pfam nós reanotamos e definimos as categorias funcionais para 55 destas CDS (Tabela S6). Nem todas as CDS diferencialmente expressas foram discutidas em detalhe, uma vez que essa tarefa corresponde a descrever o funcionamento da célula o que, certamente, seria feito de maneira incompleta, além do que a função de muitas dessas CDS permanece desconhecida.

É difícil imaginar que a expressão de uma porção tão significativa do genoma seja influenciada por um único regulador. Provavelmente muitos dos genes diferencialmente expressos apontados neste estudo sejam modulados indiretamente por Fur através de outros reguladores transcricionais, ou até mesmo de forma independente de Fur. Em *Rhizobium leguminosarum*, por exemplo, os genes modulados por ferro são regulados por RirA, que não é um ortólogo de Fur (Todd *et al.* 2002; Chao *et al.* 2005). Com a descoberta dos RNAs não-codificadores integrantes do regulon de Fur mais um nível de complexidade

foi adicionado ao estudo do metabolismo de ferro (Masse e Gottesman 2002; Wilderman et al. 2004). Apesar de não termos conseguido identificar ortólogos de RyhB e PrrF (dados não mostrados) não podemos descartar a existência de análogos desses ncRNAs em *Xylella*.

A compreensão do patossistema *Xylella* ↔ hospedeiros ↔ vetores, foi alavancada nos últimos anos pela incorporação de técnicas analíticas e moleculares, de pequena ou larga escala, e também por estudos de campo sobre a biologia reprodutiva dos insetos vetores. Investigações nas três frentes e na relação entre têm fornecido informações para a proposição de medidas que visem o manejo de *Xylella* e seus vetores e a consequente redução da incidência das doenças resultantes (Rodrigues et al. 2003; Redak et al. 2004; de Souza et al. 2005; Park et al. 2006; Wu et al. 2006; Andersen et al. 2007; Lin et al. 2007; Reddy et al. 2007; Silva et al. 2007). Muitos desses estudos só avançaram após a publicação da sequência genômica da cepa 9a5c de *Xylella*, o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado (Simpson et al., 2000). Este arcabouço de informação foi ampliado com o sequenciamento de outras cepas e esforços atuais do Laboratório de Bioinformática do Laboratório Nacional de Computação Científica (<http://www.xylella.incc.br/>) visando padronizar a anotação dos genes de *Xylella*, facilitarão os estudos sobre a biologia da *Xylella* e sua interação com seus hospedeiros e vetores. Além do esforço de padronização da nomenclatura de genes, é altamente desejável pela comunidade interessada no estudo desse patossistema que estratégias de recuperação de informações dispersas em artigos e páginas na Internet sejam desenvolvidas facilitando ainda mais a integração dos avanços na área. *Xylella fastidiosa* possui aspectos distintos de dos fitopatógenos classicamente estudados como, por exemplo, a ausência do sistema secretório do tipo III e em contraponto, a significativa expressão de efetores como hemolisinas e colicinas do tipo V. Estes, e outros aspectos merecem ser profundamente explorados, como uma etapa importante para o desenvolvimento de estratégias para o controle definitivo das doenças causadas por *Xylella*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aakra, A., O. L. Nyquist, L. Snipen, T. S. Reiersen and I. F. Nes (2007). Survey of genomic diversity among *Enterococcus faecalis* strains by microarray-based comparative genomic hybridization. *Appl Environ Microbiol* **73**(7): 2207-17.
- Adams, M. D., J. M. Kelley, J. D. Gocayne, M. Dubnick, M. H. Polymeropoulos, H. Xiao, C. R. Merrill, A. Wu, B. Olde, R. F. Moreno, *et al.* (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**(5013): 1651-6.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3): 403-10.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Andersen, P. C., B. V. Brodbeck, S. Oden, A. Shriner and B. Leite (2007). Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth, biofilm formation and aggregation of *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett*.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 215-37.
- Ausubel, F. F., M (1995). *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons.
- Baichoo, N. and J. D. Helmann (2002). Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**(21): 5826-32.
- Baichoo, N., T. Wang, R. Ye and J. D. Helmann (2002). Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* **45**(6): 1613-29.
- Balashova, N. V., R. Diaz, S. V. Balashov, J. A. Crosby and S. C. Kachlany (2006). Regulation of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* leukotoxin secretion by iron. *J Bacteriol* **188**(24): 8658-61.
- Barbosa, R. L. and C. E. Benedetti (2007). BigR, a Transcriptional Repressor from Plant-Associated Bacteria, Regulates an Operon Implicated in Biofilm Growth. *J Bacteriol*.
- Barton, H. A., Z. Johnson, C. D. Cox, A. I. Vasil and M. L. Vasil (1996). Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol* **21**(5): 1001-17.
- Beatson, S. A., C. B. Whitchurch, J. L. Sargent, R. C. Levesque and J. S. Mattick (2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**(13): 3605-13.
- Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane and P. M. Small (1999). Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**(5419): 1520-3.
- Bereswill, S., S. Greiner, A. H. van Vliet, B. Waidner, F. Fassbinder, E. Schiltz, J. G. Kusters and M. Kist (2000). Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**(21): 5948-53.
- Berish, S. A., S. Subbarao, C. Y. Chen, D. L. Trees and S. A. Morse (1993). Identification and cloning of a fur homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **61**(11): 4599-606.
- Bhattacharyya, A., S. Stilwagen, N. Ivanova, M. D'Souza, A. Bernal, A. Lykidis, V. Kapatral, I. Anderson, N. Larsen, T. Los, *et al.* (2002a). Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12403-8.
- Bhattacharyya, A., S. Stilwagen, G. Reznik, H. Feil, W. S. Feil, I. Anderson, A. Bernal, M. D'Souza, N. Ivanova, V. Kapatral, *et al.* (2002b). Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Res* **12**(10): 1556-63.
- Bijlsma, J. J., B. Waidner, A. H. Vliet, N. J. Hughes, S. Hag, S. Bereswill, D. J. Kelly, C. M. Vandenbroucke-Grauls, M. Kist and J. G. Kusters (2002). The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* **70**(2): 606-11.
- Binnewies, T. T., Y. Motro, P. F. Hallin, O. Lund, D. Dunn, T. La, D. J. Hampson, M. Bellgard, T. M. Wassenaar and D. W. Ussery (2006). Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics* **6**(3): 165-85.
- Bjarnason, J., C. M. Southward and M. G. Surette (2003). Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *Journal of Bacteriology* **185**(16): 4973-4982.

- Borneman, A. R., Z. D. Zhang, J. Rozowsky, M. R. Seringhaus, M. Gerstein and M. Snyder (2007). Transcription factor binding site identification in yeast: a comparison of high-density oligonucleotide and PCR-based microarray platforms. *Funct Integr Genomics*.
- Boyer, A. E. and P. C. Tai (1998). Characterization of the *cvaA* and *cvi* promoters of the colicin V export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J Bacteriol* **180**(7): 1662-72.
- Boyle-Vavra, S., M. So and H. S. Seifert (1993). Transcriptional control of gonococcal *pilE* expression: involvement of an alternate sigma factor. *Gene* **137**(2): 233-6.
- Braun, V. and H. Killmann (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**(3): 104-9.
- Brazma, A., P. Hingamp, J. Quackenbush, G. Sherlock, P. Spellman, C. Stoeckert, J. Aach, W. Ansorge, C. A. Ball, H. C. Causton, *et al.* (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**(4): 365-71.
- Bsat, N., A. Herbig, L. Casillas-Martinez, P. Setlow and J. D. Helmann (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**(1): 189-98.
- Bullen, J., E. Griffiths, H. Rogers and G. Ward (2000). Sepsis: the critical role of iron. *Microbes Infect* **2**(4): 409-15.
- Carrick, C. S., J. A. Fyfe and J. K. Davies (1997). The normally silent sigma54 promoters upstream of the *pilE* genes of both *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* are functional when transferred to *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **198**(1-2): 89-97.
- Chang, C. J., M. Garnier, L. Zreik, V. Rossetti and J. M. Bove (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**(3): 137-142.
- Chang, W. S., M. van de Mortel, L. Nielsen, G. N. de Guzman, X. Li and L. J. Halverson (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol*.
- Chao, T. C., J. Buhrmester, N. Hansmeier, A. Puhler and S. Weidner (2005). Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**(10): 5969-82.
- Chauhan, S. and M. R. O'Brian (1993). Bradyrhizobium japonicum delta-aminolevulinic acid dehydratase is essential for symbiosis with soybean and contains a novel metal-binding domain. *J Bacteriol* **175**(22): 7222-7.
- Cehade, H. and V. Braun (1988). Iron-regulated synthesis and uptake of colicin V. *FEMS Microbiology Letters* **52**(S2): 177-182.
- Coltri, P. P. and Y. B. Rosato (2005). Transcription analysis of *pilS* and *xpsEL* genes from *Xylella fastidiosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**(3): 253-7.
- Costa de Oliveira, R., G. M. Yanai, N. H. Muto, D. B. Leite, A. A. de Souza, H. D. Coletta Filho, M. A. Machado and L. R. Nunes (2002). Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *Xylella fastidiosa* strains. *FEMS Microbiol Lett* **216**(1): 15-21.
- Coy, M. and J. B. Neilands (1991). Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* **30**(33): 8201-10.
- Crooks, G. E., G. Hon, J. M. Chandonia and S. E. Brenner (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**(6): 1188-90.
- Crosa, J. H., A. R. Mey and S. M. Payne (2004). *Iron Transport in Bacteria*. Washington, DC, ASM Press.
- Cui, Y., A. Chatterjee, H. Hasegawa, V. Dixit, N. Leigh and A. K. Chatterjee (2005). ExpR, a LuxR homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, activates transcription of *rsmA*, which specifies a global regulatory RNA-binding protein. *J Bacteriol* **187**(14): 4792-803.
- da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, *et al.* (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**(6887): 459-63.
- da Silva, F. R., A. L. Vettore, E. L. Kemper, A. Leite and P. Arruda (2001). Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *Fems Microbiology Letters* **203**(2): 165-171.

- da Silva Neto, J. F., T. Koide, S. L. Gomes and M. V. Marques (2007). The single extracytoplasmic-function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism. *J Bacteriol* **189**(2): 551-60.
- Davis, M., W. French and N. Schaad (1981). Axenic Culture Of The Bacteria Associated With Phony Disease Of Peach And Plum Leaf Scald. *Curr Microbiol* **6**(5): 309-314.
- de Lorenzo, V., F. Giovannini, M. Herrero and J. B. Neilands (1988). Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J Mol Biol* **203**(4): 875-84.
- de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero and J. B. Neilands (1987). Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J Bacteriol* **169**(6): 2624-30.
- De Reuse, H. and M. K. Taha (1997). RegF, an SspA homologue, regulates the expression of the *Neisseria gonorrhoeae* pilE gene. *Res Microbiol* **148**(4): 289-303.
- de Souza, A. A., M. A. Takita, H. D. Coletta-Filho, C. Caldana, G. H. Goldman, G. M. Yanai, N. H. Muto, R. C. de Oliveira, L. R. Nunes and M. A. Machado (2003). Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **16**(10): 867-75.
- de Souza, A. A., M. A. Takita, E. O. Pereira, H. D. Coletta-Filho and M. A. Machado (2005). Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Curr Microbiol* **50**(4): 223-8.
- de Torres-Zabala, M., W. Truman, M. H. Bennett, G. Lafforgue, J. W. Mansfield, P. Rodriguez Egea, L. Bogre and M. Grant (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo J* **26**(5): 1434-43.
- Delany, I., G. Spohn, R. Rappuoli and V. Scarlato (2001). The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **42**(5): 1297-309.
- Dellagi, A., M. N. Brisset, J. P. Paulin and D. Expert (1998). Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **11**(8): 734-42.
- Denny, T. P. (1995). Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **33**: 173-197.
- Desai, P. J., A. Angerer and C. A. Genco (1996). Analysis of Fur binding to operator sequences within the *Neisseria gonorrhoeae* fbpA promoter. *J Bacteriol* **178**(16): 5020-3.
- Dharmadi, Y. and R. Gonzalez (2004). DNA microarrays: experimental issues, data analysis, and application to bacterial systems. *Biotechnol Prog* **20**(5): 1309-24.
- Di Lorenzo, M., S. Poppelaars, M. Stork, M. Nagasawa, M. E. Tolmasky and J. H. Crosa (2004). A nonribosomal peptide synthetase with a novel domain organization is essential for siderophore biosynthesis in *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **186**(21): 7327-36.
- Doddapaneni, H., J. Yao, H. Lin, M. A. Walker and E. L. Civerolo (2006). Analysis of the genome-wide variations among multiple strains of the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics* **7**: 225.
- Dow, J. M. and M. J. Daniels (2000). *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* **17**(4): 263-71.
- Dubrac, S. and D. Touati (2000). Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the sodB promoter. *J Bacteriol* **182**(13): 3802-8.
- Dubrac, S. and D. Touati (2002). Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**(Pt 1): 147-56.
- Ducey, T. F., M. B. Carson, J. Orvis, A. P. Stintzi and D. W. Dyer (2005). Identification of the iron-responsive genes of *Neisseria gonorrhoeae* by microarray analysis in defined medium. *J Bacteriol* **187**(14): 4865-74.
- Eddy, S. R., G. Mitchison and R. Durbin (1995). Maximum discrimination hidden Markov models of sequence consensus. *J Comput Biol* **2**(1): 9-23.
- Enard, C., A. Dolez and D. Expert (1988). Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J Bacteriol* **170**(6): 2419-26.
- Enard, C. and D. Expert (2000). Characterization of a tonB mutation in *Erwinia chrysanthemi* 3937: TonB(Ech) is a member of the enterobacterial TonB family. *Microbiology* **146** ( Pt 8): 2051-8.
- Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo (1998). Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**(3): 537-47.
- Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**(20): 6223-9.
- Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo (2000). Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(32): 24709-14.



- Etienne, W., M. H. Meyer, J. Peppers and R. A. Meyer, Jr. (2004). Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *Biotechniques* **36**(4): 618-20, 622, 624-6.
- Expert, D. (1999). Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 307-334.
- Expert, D., C. Enard and C. Masclaux (1996). The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **4**(6): 232-7.
- Feng, D. F. and R. F. Doolittle (1987). Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J Mol Evol* **25**(4): 351-60.
- Finn, R. D., J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, *et al.* (2006). Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D247-51.
- Fitzgerald, J. R., D. E. Sturdevant, S. M. Mackie, S. R. Gill and J. M. Musser (2001). Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8821-6.
- Flint, D. H. (1996). *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J Biol Chem* **271**(27): 16068-74.
- Franza, T., C. Sauvage and D. Expert (1999). Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact* **12**(2): 119-28.
- French, W. J., D. L. Stassi and N. W. Schaad (1978). Use of Immunofluorescence for the Identification of Phony Peach Bacterium. *Phytopathology* **68**(7): 1106-1108.
- Friedman, Y. E. and M. R. O'Brian (2003). A novel DNA-binding site for the ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* **278**(40): 38395-401.
- Gilson, L., H. K. Mahanty and R. Kolter (1987). Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J Bacteriol* **169**(6): 2466-70.
- Gonzalez de Peredo, A., C. Saint-Pierre, J. M. Latour, I. Michaud-Soret and E. Forest (2001). Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* **310**(1): 83-91.
- Gonzalez-Kristeller, D. C. (2007). Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelium discoideum*. Dept. Bioquímica. São Paulo, *Universidade de São Paulo*: 149.
- Grant, S. R., E. J. Fisher, J. H. Chang, B. M. Mole and J. L. Dangl (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425-49.
- Grifantini, R., E. Bartolini, A. Muzzi, M. Draghi, E. Frigimelica, J. Berger, G. Ratti, R. Petracca, G. Galli, M. Agnusdei, *et al.* (2002). Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat Biotechnol* **20**(9): 914-21.
- Grifantini, R., S. Sebastian, E. Frigimelica, M. Draghi, E. Bartolini, A. Muzzi, R. Rappuoli, G. Grandi and C. A. Genco (2003). Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9542-7.
- Guerinot, M. L. (1994). Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**: 743-72.
- Guilhabert, M. R. and B. C. Kirkpatrick (2005). Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute a biofilm maturation to *X. fastidiosa* and colonization and attenuate virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **18**(8): 856-68.
- Gumucio, D. L., H. Heilstedt-Williamson, T. A. Gray, S. A. Tarle, D. A. Shelton, D. A. Tagle, J. L. Slightom, M. Goodman and F. S. Collins (1992). Phylogenetic footprinting reveals a nuclear protein which binds to silencer sequences in the human gamma and epsilon globin genes. *Mol Cell Biol* **12**(11): 4919-29.
- Hamza, I., S. Chauhan, R. Hassett and M. R. O'Brian (1998). The bacterial *irr* protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J Biol Chem* **273**(34): 21669-74.
- Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**(2): 172-7.
- Heinrichs, J. H., L. E. Gatlin, C. Kunsch, G. H. Choi and M. S. Hanson (1999). Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181**(5): 1436-43.
- Heller, M. J. (2002). DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* **4**: 129-53.

- Hickey, E. K. and N. P. Cianciotto (1994). Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila* fur gene. *Gene* **143**(1): 117-21.
- Hinchliffe, S. J., K. E. Isherwood, R. A. Stabler, M. B. Prentice, A. Rakin, R. A. Nichols, P. C. Oyston, J. Hinds, R. W. Titball and B. W. Wren (2003). Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res* **13**(9): 2018-29.
- Hirono, I., N. Tange and T. Aoki (1997). Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. *Mol Microbiol* **24**(4): 851-6.
- Hopkins, D. L. (1989). *Xylella-Fastidiosa* - Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. *Annual Review of Phytopathology* **27**: 271-290.
- Hopkins, D. L. and A. H. Purcell (2002). *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease* **86**(10): 1056-1066.
- Jenson, S. D., R. S. Robetorye, S. D. Bohling, J. A. Schumacher, J. W. Morgan, M. S. Lim and K. S. Elenitoba-Johnson (2003). Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol Pathol* **56**(6): 307-12.
- Kahn, D. and G. Ditta (1991). Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. *Mol Microbiol* **5**(4): 987-97.
- Kandror, O., L. Busconi, M. Sherman and A. L. Goldberg (1994). Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *J Biol Chem* **269**(38): 23575-82.
- Katayama-Fujimura, Y., S. Gottesman and M. R. Maurizi (1987). A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**(10): 4477-85.
- Katzen, F., D. U. Ferreira, C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Puhler and L. Ielpi (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: Effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *Journal of Bacteriology* **180**(7): 1607-1617.
- Kaushal, D., B. G. Schroeder, S. Tyagi, T. Yoshimatsu, C. Scott, C. Ko, L. Carpenter, J. Mehrotra, Y. C. Manabe, R. D. Fleischmann, *et al.* (2002). Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8330-5.
- Kitphati, W., P. Ngok-Ngam, S. Suwanmaneerat, R. Sukchawalit and S. Mongkolsuk (2007). The *Agrobacterium tumefaciens* fur has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, oxidative stress response and full virulence. *Appl Environ Microbiol*.
- Koide, T., R. Z. Vencio and S. L. Gomes (2006). Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* **188**(16): 5821-30.
- Koide, T., P. A. Zaini, L. M. Moreira, R. Z. Vencio, A. Y. Matsukuma, A. M. Durham, D. C. Teixeira, H. El-Dorry, P. B. Monteiro, A. C. da Silva, *et al.* (2004). DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J Bacteriol* **186**(16): 5442-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lambais, M. R., M. H. S. Goldman, L. E. A. Camargo and G. H. Goldman (2000). A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology* **3**(5): 459-462.
- Laub, M. T., H. H. McAdams, T. Feldblyum, C. M. Fraser and L. Shapiro (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**(5499): 2144-8.
- Lavrrar, J. L., C. A. Christoffersen and M. A. McIntosh (2002). Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **322**(5): 983-95.
- Lawrence, C. E., S. F. Altschul, M. S. Boguski, J. S. Liu, A. F. Neuwald and J. C. Wootton (1993). Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment. *Science* **262**(5131): 208-14.
- Lawrence, C. E. and A. A. Reilly (1990). An expectation maximization (EM) algorithm for the identification and characterization of common sites in unaligned biopolymer sequences. *Proteins* **7**(1): 41-51.
- Le Cam, E., D. Frechon, M. Barry, A. Fourcade and E. Delain (1994). Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 11816-20.
- Lee, H. M., S. W. Tyan, W. M. Leu, L. Y. Chen, D. C. Chen and N. T. Hu (2001). Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-xpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *J Bacteriol* **183**(2): 528-35.

- Leite, B., M. L. Ishida, E. Alves, H. Carrer, S. F. Pascholati and E. W. Kitajima (2002). Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca<sup>2+</sup> and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. *Braz J Med Biol Res* **35**(6): 645-50.
- Li, W. B., L. Zreik, N. G. Fernandes, V. S. Miranda, D. C. Teixeira, A. J. Ayres, M. Garnier and J. M. Bov (1999). A triply cloned strain of *xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Curr Microbiol* **39**(2): 106-8.
- Li, Y. X., G. X. Hao, C. D. Galvani, Y. Z. Meng, L. De la Fuente, H. C. Hoch and T. J. Burr (2007). Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology-Sgm* **153**: 719-726.
- Libby, S. J., W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. Bowe, F. C. Fang, D. G. Guiney, J. G. Songer and F. Heffron (1994). A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 489-93.
- Liew, K. J. and V. T. Chow (2006). Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *J Virol Methods* **131**(1): 47-57.
- Lin, H., H. Doddapaneni, Y. Takahashi and M. A. Walker (2007). Comparative analysis of ESTs involved in grape responses to *Xylella fastidiosa* infection. *BMC Plant Biol* **7**: 8.
- Litwin, C. M. and S. B. Calderwood (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**(2): 137-49.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lockhart, D. J., H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, *et al.* (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**(13): 1675-80.
- Loprasert, S., R. Sallabhan, S. Atichartpongkul and S. Mongkolsuk (1999). Characterization of a ferric uptake regulator (*fur*) gene from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* with unusual primary structure, genome organization, and expression patterns. *Gene* **239**(2): 251-8.
- Lucchini, S., A. Thompson and J. C. Hinton (2001). Microarrays for microbiologists. *Microbiology* **147**(Pt 6): 1403-14.
- Malnoy, M., M. Faize, J. S. Venisse, K. Geider and E. Chevreau (2005). Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. *Plant Cell Rep* **23**(9): 632-8.
- Marchler-Bauer, A. and S. H. Bryant (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**(Web Server issue): W327-31.
- Marques, M. V. and A. M. da Silva (2004). Transcriptoma. *Genômica*. L. M. (Org.). São Paulo, Atheneu: 1114.
- Marques, M. V., A. M. da Silva and S. L. Gomes (2001). Genetic organization of plasmid pXF51 from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Plasmid* **45**(3): 184-199.
- Martin, P. R., A. A. Watson, T. F. McCaul and J. S. Mattick (1995). Characterization of a five-gene cluster required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **16**(3): 497-508.
- Masclaux, C. and D. Expert (1995). Signaling Potential of Iron in Plant-Microbe Interactions - the Pathogenic Switch of Iron Transport in *Erwinia-Chrysanthemi*. *Plant Journal* **7**(1): 121-128.
- Masse, E. and S. Gottesman (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4620-5.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289-314.
- Maurer, A. P., A. Mehlitz, H. J. Mollenkopf and T. F. Meyer (2007). Gene Expression Profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during the Developmental Cycle and Iron Depletion-Mediated Persistence. *PLoS Pathog* **3**(6): e83.
- McCue, L., W. Thompson, C. Carmack, M. P. Ryan, J. S. Liu, V. Derbyshire and C. E. Lawrence (2001). Phylogenetic footprinting of transcription factor binding sites in proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **29**(3): 774-82.
- Meng, Y., Y. Li, C. D. Galvani, G. Hao, J. N. Turner, T. J. Burr and H. C. Hoch (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol* **187**(16): 5560-7.
- Merrell, D. S., L. J. Thompson, C. C. Kim, H. Mitchell, L. S. Tompkins, A. Lee and S. Falkow (2003). Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect Immun* **71**(11): 6510-25.
- Michel, A., F. Agerer, C. R. Hauck, M. Herrmann, J. Ullrich, J. Hacker and K. Ohlsen (2006). Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *J Bacteriol* **188**(16): 5783-96.

- Miethke, M., H. Westers, E. J. Blom, O. P. Kuipers and M. A. Marahiel (2006). Iron starvation triggers the stringent response and induces amino acid biosynthesis for bacillibactin production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**(24): 8655-7.
- Mircetich, S. M., S. K. Lowe, W. J. Moller and G. Nyland (1976). Etiology of Almond Leaf Scorch Disease and Transmission of Causal Agent. *Phytopathology* **66**(1): 17-24.
- Mollenhauer, H. H. and D. L. Hopkins (1974). Ultrastructural Study of Pierce's Disease Bacterium in Grape Xylem Tissue. *Journal of Bacteriology* **119**(2): 612-618.
- Mollenhauer, H. H. and D. L. Hopkins (1976). Xylem Morphology of Pierce's Disease-Infected Grapevines with Different Levels of Tolerance. *Physiological Plant Pathology* **9**(1): 95-100.
- Monteiro, P. B., J. Renaudin, S. Jagoueix-Eveillard, A. J. Ayres, M. Garnier and J. M. Bove (2001). *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease* **85**(3): 246-251.
- Moreira, L. M., R. F. De Souza, L. A. Digiampietri, A. C. Da Silva and J. C. Setubal (2005). Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *Omic* **9**(1): 43-76.
- Mount, D. W. (2001). *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, A. Bateman, D. Binns, P. Bork, V. Buillard, L. Cerutti, R. Copley, et al. (2007). New developments in the InterPro database. *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D224-8.
- Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet and A. Cloeckert (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* **8**(7): 1915-22.
- Myers, G. S., D. Parker, K. Al-Hasani, R. M. Kennan, T. Seemann, Q. Ren, J. H. Badger, J. D. Selengut, R. T. Deboy, H. Tettelin, et al. (2007). Genome sequence and identification of candidate vaccine antigens from the animal pathogen *Dichelobacter nodosus*. *Nat Biotechnol* **25**(5): 569-75.
- Nachin, L., L. Loiseau, D. Expert and F. Barras (2003). SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *Embo J* **22**(3): 427-37.
- Nagel, G., A. Lahrz and P. Dersch (2001). Environmental control of invasins expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol* **41**(6): 1249-69.
- Neves, E. M., M. Dayoub, D. S. Dragone and M. F. Neves (2001). Brazilian Citrus industry: economic and financial effects, 1996-2000. *Rev. Bras. Frutic.* **23**: 432-436.
- Nierman, W. C., J. A. Eisen, R. D. Fleischmann and C. M. Fraser (2000). Genome data: what do we learn? *Curr Opin Struct Biol* **10**(3): 343-8.
- Nunes, L. R., Y. B. Rosato, N. H. Muto, G. M. Yanai, V. S. da Silva, D. B. Leite, E. R. Goncalves, A. A. de Souza, H. D. Coletta-Filho, M. A. Machado, et al. (2003). Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. *Genome Res* **13**(4): 570-8.
- Ocaktan, A., H. Yoneyama and T. Nakae (1997). Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-*oprM* drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **272**(35): 21964-9.
- Ochsner, U. A., A. I. Vasil and M. L. Vasil (1995). Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *J Bacteriol* **177**(24): 7194-201.
- Ochsner, U. A. and M. L. Vasil (1996). Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4409-14.
- Ochsner, U. A., P. J. Wilderman, A. I. Vasil and M. L. Vasil (2002). GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **45**(5): 1277-87.
- Ogura, M., H. Yamaguchi, K. Yoshida, Y. Fujita and T. Tanaka (2001). DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res* **29**(18): 3804-13.
- Oh, C. S. and S. V. Beer (2005). Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiol Lett* **253**(2): 185-92.
- Osiro, D., L. A. Colnago, A. M. Otoboni, E. G. Lemos, A. A. de Souza, H. D. Coletta Filho and M. A. Machado (2004). A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiol Lett* **236**(2): 313-8.
- O'Toole, R., D. L. Milton, P. Horstedt and H. Wolf-Watz (1997). RpoN of the fish pathogen *Vibrio (Listonella) anguillarum* is essential for flagellum production and virulence by the water-borne but not intraperitoneal route of inoculation. *Microbiology* **143** ( Pt 12): 3849-59.

- Outten, F. W., O. Djaman and G. Storz (2004). A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **52**(3): 861-72.
- Panda, S., T. K. Sato, G. M. Hampton and J. B. Hogenesch (2003). An array of insights: application of DNA chip technology in the study of cell biology. *Trends Cell Biol* **13**(3): 151-6.
- Panina, E. M., A. A. Mironov and M. S. Gelfand (2001). Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **29**(24): 5195-206.
- Park, Y. L., T. M. Perring, R. Yacoub, D. W. Bartels and D. Elms (2006). Spatial and temporal dynamics of overwintering *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *J Econ Entomol* **99**(6): 1936-42.
- Parker, D., R. M. Kennan, G. S. Myers, I. T. Paulsen, J. G. Songer and J. I. Rood (2006). Regulation of Type IV Fimbrial Biogenesis in *Dichelobacter nodosus*. *J Bacteriol* **188**(13): 4801-11.
- Pashalidis, S., L. M. Moreira, P. A. Zaini, J. C. Campanharo, L. M. Alves, L. P. Ciapina, R. Z. Vencio, E. G. Lemos, A. M. Da Silva and A. C. Da Silva (2005). Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. *Omics* **9**(1): 77-90.
- Paustian, M. L., B. J. May and V. Kapur (2001). *Pasteurella multocida* gene expression in response to iron limitation. *Infect Immun* **69**(6): 4109-15.
- Pevzner, P. A. and S. H. Sze (2000). Combinatorial approaches to finding subtle signals in DNA sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **8**: 269-78.
- Pohl, E., J. C. Haller, A. Mijovilovich, W. Meyer-Klaucke, E. Garman and M. L. Vasil (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**(4): 903-15.
- Poole, K., D. E. Heinrichs and S. Neshat (1993). Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* **10**(3): 529-44.
- Porankiewicz, J., J. Wang and A. K. Clarke (1999). New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol* **32**(3): 449-58.
- Preston, G. M., Guttman, D. S., Toth, I. (2007). Genomic Analysis of Plant Pathogenic Bacteria. *Bacterial Pathogenomics*. M. J. Pallen. Washington, DC, ASM Press.
- Prince, R. W., D. G. Storey, A. I. Vasil and M. L. Vasil (1991). Regulation of *toxA* and *regA* by the *Escherichia coli fur* gene and identification of a Fur homologue in *Pseudomonas aeruginosa* PA103 and PA01. *Mol Microbiol* **5**(11): 2823-31.
- Purcell, A. H. and D. L. Hopkins (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 131-151.
- Purcell, A. H., S. R. Saunders, M. Hendson, M. E. Grebus and M. J. Henry (1999). Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Phytopathology* **89**(1): 53-58.
- Qian, W., Y. Jia, S. X. Ren, Y. Q. He, J. X. Feng, L. F. Lu, Q. Sun, G. Ying, D. J. Tang, H. Tang, *et al.* (2005). Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res* **15**(6): 757-67.
- Quackenbush, J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* **32 Suppl**: 496-501.
- Quatrini, R., C. Lefimil, D. S. Holmes and E. Jedlicki (2005). The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **151**(Pt 6): 2005-15.
- Ratledge, C. and L. G. Dover (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.
- Read, T. D., S. N. Peterson, N. Tourasse, L. W. Baillie, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, *et al.* (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* **423**(6935): 81-6.
- Redak, R. A., A. H. Purcell, J. R. Lopes, M. J. Blua, R. F. Mizell, 3rd and P. C. Andersen (2004). The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu Rev Entomol* **49**: 243-70.
- Reddy, J. D., S. L. Reddy, D. L. Hopkins and D. W. Gabriel (2007). TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol Plant Microbe Interact* **20**(4): 403-10.
- Reitzer, L. and B. L. Schneider (2001). Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(3): 422-44, table of contents.
- Rodrigues, J. L., M. E. Silva-Stenico, J. E. Gomes, J. R. Lopes and S. M. Tsai (2003). Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* sequences. *Appl Environ Microbiol* **69**(7): 4249-55.

- Roper, M. C., L. C. Greve, J. G. Warren, J. M. Labavitch and B. C. Kirkpatrick (2007). *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(4): 411-419.
- Rossetti, V., M. Garnier, J. M. Bove, M. J. G. Beretta, A. R. R. Teixeira, J. A. Quaggio and J. D. Denegri (1990). Occurrence of Xylem-Restricted Bacteria in Sweet Orange Trees Affected by Chlorotic Variegation, a New Citrus Disease in Brazil. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **310**(8): 345-349.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-86.
- Sacco, M., E. Ricca, R. Losick and S. Cutting (1995). An additional GerE-controlled gene encoding an abundant spore coat protein from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**(2): 372-7.
- Sala, C., F. Forti, E. Di Florio, F. Canneva, A. Milano, G. Riccardi and D. Ghisotti (2003). *Mycobacterium tuberculosis* FurA autoregulates its own expression. *J Bacteriol* **185**(18): 5357-62.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, J. W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, J. R. Brands, G. Venema and J. Kok (1998). A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecular Microbiology* **27**(2): 299-310.
- Scarpari, L. M., M. R. Lambais, D. S. Silva, D. M. Carraro and H. Carrer (2003). Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro. *FEMS Microbiol Lett* **222**(1): 83-92.
- Schade, A. L. and L. Caroline (1946). An Iron-Binding Component in Human Blood Plasma. *Science* **104**(2702): 340-341.
- Schena, M., R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier and R. W. Davis (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol* **16**(7): 301-6.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**(5235): 467-70.
- Schoolnik, G. K. (2002). Microarray analysis of bacterial pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **46**: 1-45.
- Schulze, A. and J. Downward (2001). Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol* **3**(8): E190-5.
- Setubal, J. C., L. M. Moreira and A. C. da Silva (2005). Bacterial phytopathogens and genome science. *Curr Opin Microbiol* **8**(5): 595-600.
- Sherlock, G. (2000). Analysis of large-scale gene expression data. *Curr Opin Immunol* **12**(2): 201-5.
- Shinohara, M., N. Nakajima and Y. Uehara (2007). Purification and characterization of a novel esterase (beta-hydroxypalmitate methyl ester hydrolase) and prevention of the expression of virulence by *Ralstonia solanacearum*. *J Appl Microbiol* **103**(1): 152-62.
- Siddharthan, R., E. D. Siggia and E. van Nimwegen (2005). PhyloGibbs: a Gibbs sampling motif finder that incorporates phylogeny. *PLoS Comput Biol* **1**(7): e67.
- Silva, M. R., A. M. Meneguim, F. G. Paiao, L. Meneguim, M. G. Canteri and R. P. Leite, Jr. (2007). [Natural infectivity of *Xylella fastidiosa* Wells et al. in sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) from coffee plantations of Parana, Brazil]. *Neotrop Entomol* **36**(2): 274-81.
- Silva-Stenico, M. E., F. T. Pacheco, J. L. Rodrigues, E. Carrilho and S. M. Tsai (2005). Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol Res* **160**(4): 429-36.
- Simpson, A. J., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, et al. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**(6792): 151-7.
- Singh, A. K., L. M. McIntyre and L. A. Sherman (2003). Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **132**(4): 1825-39.
- Sitnikov, D. M., J. B. Schineller and T. O. Baldwin (1995). Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* **17**(5): 801-12.
- Smoot, L. M., J. C. Smoot, M. R. Graham, G. A. Somerville, D. E. Sturdevant, C. A. Migliaccio, G. L. Sylva and J. M. Musser (2001). Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10416-21.

- Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockett, D. E. Johnson, M. S. Donnenberg, R. A. Welch and H. L. Mobley (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* **72**(11): 6373-81.
- Souza, L. C., N. A. Wulff, P. Gaurivaud, A. G. Mariano, A. C. Virgilio, J. L. Azevedo and P. B. Monteiro (2006). Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC gumB and gumF genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. *FEMS Microbiol Lett* **257**(2): 236-42.
- Stintzi, A. (2003). Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. *J Bacteriol* **185**(6): 2009-16.
- Stojiljkovic, I., A. J. Baumber and K. Hantke (1994). Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a fur titration assay. *J Mol Biol* **236**(2): 531-45.
- Studholme, D. J., J. A. Downie and G. M. Preston (2005). Protein domains and architectural innovation in plant-associated Proteobacteria. *BMC Genomics* **6**(1): 17.
- Subramoni, S. and R. V. Sonti (2005). Growth deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* fur mutant in rice leaves is rescued by ascorbic acid supplementation. *Mol Plant Microbe Interact* **18**(7): 644-51.
- Tang, X., Y. Xiao and J. M. Zhou (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **19**(11): 1159-66.
- Taniguchi, M., K. Miura, H. Iwao and S. Yamanaka (2001). Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics* **71**(1): 34-9.
- Tao, X., J. Boyd and J. R. Murphy (1992). Specific binding of the diphtheria tox regulatory element DtxR to the tox operator requires divalent heavy metal ions and a 9-base-pair interrupted palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 5897-901.
- Thomas, C. E. and P. F. Sparling (1994). Identification and cloning of a fur homologue from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **11**(4): 725-37.
- Thompson, D. K., A. S. Beliaev, C. S. Giometti, S. L. Tollaksen, T. Khare, D. P. Lies, K. H. Nealson, H. Lim, J. Yates, 3rd, C. C. Brandt, *et al.* (2002). Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (fur) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of fur in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* **68**(2): 881-92.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-82.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994a). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22): 4673-80.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994b). Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. *Comput Appl Biosci* **10**(1): 19-29.
- Thomson, N. R., A. Cox, B. W. Bycroft, G. S. Stewart, P. Williams and G. P. Salmond (1997). The rap and hor proteins of *Erwinia*, *Serratia* and *Yersinia*: a novel subgroup in a growing superfamily of proteins regulating diverse physiological processes in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **26**(3): 531-44.
- Thorne, E. T., J. F. Stevenson, T. L. Rost, J. M. Labavitch and M. A. Matthews (2006). Pierce's disease symptoms: Comparison with symptoms of water deficit and the impact of water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**(1): 1-11.
- Tiaden, A., T. Spirig, S. S. Weber, H. Bruggemann, R. Bosshard, C. Buchrieser and H. Hilbi (2007). The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cell Microbiol*.
- Todd, J. D., M. Wexler, G. Sawers, K. H. Yeoman, P. S. Poole and A. W. Johnston (2002). RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **148**(Pt 12): 4059-71.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**(1): 1-6.
- Tuanyok, A., H. S. Kim, W. C. Nierman, Y. Yu, J. Dunbar, R. A. Moore, P. Baker, M. Tom, J. M. Ling and D. E. Woods (2005). Genome-wide expression analysis of iron regulation in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* using DNA microarrays. *FEMS Microbiol Lett* **252**(2): 327-35.
- Van Sluys, M. A., M. C. de Oliveira, C. B. Monteiro-Vitorello, C. Y. Miyaki, L. R. Furlan, L. E. Camargo, A. C. da Silva, D. H. Moon, M. A. Takita, E. G. Lemos, *et al.* (2003). Comparative analyses of

- the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* **185**(3): 1018-26.
- Van Sluys, M. A., C. B. Monteiro-Vitorello, L. E. Camargo, C. F. Menck, A. C. Da Silva, J. A. Ferro, M. C. Oliveira, J. C. Setubal, J. P. Kitajima and A. J. Simpson (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 169-89.
- Vasil, M. L. and U. A. Ochsner (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**(3): 399-413.
- Vasil, M. L., U. A. Ochsner, Z. Johnson, J. A. Colmer and A. N. Hamood (1998). The fur-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator ptxR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**(24): 6784-8.
- Velculescu, V. E., S. L. Madden, L. Zhang, A. E. Lash, J. Yu, C. Rago, A. Lal, C. J. Wang, G. A. Beaudry, K. M. Ciriello, *et al.* (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* **23**(4): 387-8.
- Vencio, R. Z. and T. Koide (2005). HTself: Self-Self Based Statistical Test for Low Replication Microarray Studies. *DNA Res* **12**(3): 211-4.
- Wan, X. F., N. C. Verberkmoes, L. A. McCue, D. Stanek, H. Connelly, L. J. Hauser, L. Wu, X. Liu, T. Yan, A. Leaphart, *et al.* (2004). Transcriptomic and proteomic characterization of the Fur regulon in the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* **186**(24): 8385-400.
- Wang, T. and G. D. Stormo (2003). Combining phylogenetic data with co-regulated genes to identify regulatory motifs. *Bioinformatics* **19**(18): 2369-80.
- Wei, Y., J. M. Lee, C. Richmond, F. R. Blattner, J. A. Rafalski and R. A. LaRossa (2001). High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**(2): 545-56.
- Welch, M., D. E. Todd, N. A. Whitehead, S. J. McGowan, B. W. Bycroft and G. P. Salmond (2000). N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *Embo J* **19**(4): 631-41.
- Whitby, P. W., T. M. Vanwagoner, T. W. Seale, D. J. Morton and T. L. Stull (2006). Transcriptional profile of *Haemophilus influenzae*: effects of iron and heme. *J Bacteriol* **188**(15): 5640-5.
- Wiggerich, H. G. and A. Puhler (2000). The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*). *Microbiology* **146** ( Pt 5): 1053-60.
- Wilderman, P. J., N. A. Sowa, D. J. FitzGerald, P. C. FitzGerald, S. Gottesman, U. A. Ochsner and M. L. Vasil (2004). Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9792-7.
- Wilson, M., J. DeRisi, H. H. Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P. O. Brown and G. K. Schoolnik (1999). Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12833-8.
- Wolfe, A. J., D. S. Millikan, J. M. Campbell and K. L. Visick (2004). *Vibrio fischeri* sigma54 controls motility, biofilm formation, luminescence, and colonization. *Appl Environ Microbiol* **70**(4): 2520-4.
- Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C. G. Miyada and S. Lory (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8484-9.
- Wooldridge, K. G., M. Kizil, D. B. Wells and D. A. Ala'aldeen (2005). Unusual genetic organization of a functional type I protein secretion system in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **73**(9): 5554-67.
- Wu, D., S. C. Daugherty, S. E. Van Aken, G. H. Pai, K. L. Watkins, H. Khouri, L. J. Tallon, J. M. Zaborsky, H. E. Dunbar, P. L. Tran, *et al.* (2006). Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol* **4**(6): e188.
- Wulff, N. A., H. Carrer and S. F. Pascholati (2006). Expression and Purification of Cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **53**(3): 198-203.
- Xiao, F., S. M. Goodwin, Y. Xiao, Z. Sun, D. Baker, X. Tang, M. A. Jenks and J. M. Zhou (2004). *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *Embo J* **23**(14): 2903-13.
- Yang, Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai and T. P. Speed (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**(4): e15.
- Yuan, L., J. D. Hillman and A. Progulsk-Fox (2005). Microarray analysis of quorum-sensing-regulated genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **73**(7): 4146-54.



- Zheng, M., X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa and G. Storz (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**(15): 4562-70.
- Zhou, L., X. H. Lei, B. R. Bochner and B. L. Wanner (2003). Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol* **185**(16): 4956-72.
- Zhou, Y. X., P. Kalocsai, J. Y. Chen and S. Shams (2000). Information Processing Issues and Solutions Associated with Microarray Technology. *Microarray biochip technology*. M. Shena. Natick, Eaton: 297.

## 7. MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1:** Lista das 112 Fur boxes caracterizadas em outras bactérias.

**Tabela S2:** CDS reguladas positivamente sob excesso de ferro.

**Tabela S3:** CDS reguladas negativamente sob excesso de ferro.

**Tabela S4:** CDS reguladas positivamente sob carência de ferro.

**Tabela S5:** CDS reguladas negativamente sob carência de ferro.

**Tabela S6:** CDS previamente hipotéticas que foram reanotadas neste trabalho.

Nas Tabelas S2 a S6, Gene ID é referente à anotação feita por Simpon *et al.* (2000) e a máxima razão de expressão apresentada foi selecionada a partir de um ponto dos quatro amostrados na série temporal, em relação ao tempo zero.

**Tabela S1:** Lista das 112 Fur boxes caracterizadas em outras bactérias.

Gene_Organismo	Sequência Fur box
LucA_E.coli	GATAATGAGAATCATTATT
Cir_E.coli	GATAATTGTTATCGTTTGC
Fur_E.coli	TATAATGATACGCATTATC
FeeI_E.coli	TGTAATGATAACCATTCTC
sIIA_E.coli	GAATATGATTATCATTTTTC
tepB_E.coli	GAAAATGAGAAGCATTATT
emC_E.coli	ATAAATGATAATCATTATT
sodA_E.coli	GATAATCATTTTCAATATC
fptA_E.coli	GATAATGCTTATCAAAT
piuA_P.aeruginosa	GCCAATGATATTGATTTGC
VC0284_V.cholerae	GAAAATTACTATCATTGT
ydiE_E.coli	GATAATAAGAATCATTGTT
b1995_E.coli	GAAAATAATTATCATTACA
hemP_Y.enterocolitica	ATGATTGATAATGCTTATC
hemP_S.typhi	CACAATGATTATTATTATC
b3070_E.coli	AACAATCATTATCATTTGC
viuB_V.cholerae	GTTAATGATATACATTCTC
viuB_S.typhi	AACAATCATTATCATTAA
yhh_xE.coli	GACAATGATTATTATTGTC
yhhX_S.typhi	GCGAATGAGAATGATTATT
yvaA_B.subtilis	GATATTAATTCCCATTATA
Z1026_E.coli	GATAATGCTTATCAAAT
Z3159_E.coli	GAAAATAATTATCATTACA
yqjH_E.coli	AACAATCATTATCATTTGC
iha_E.coli	ATAAATTATTCTCATTATT
iha_Y.pestis	GATAATTGATATCATTTGC
Z2267_E.coli	AATAATGATTACCATTCCC
Z2267_S.typhi	AATAATGATTATTATTCTC
Z2268_E.coli	GGGAATGGTAATCATTATT
fyuA_S.typhi	GAGATTAATAATGATTATT
fyuA_Y.pestis	AGAAATAGTTATCATTTTC
Z4385_E.coli	GAGAATGAGTTTTATTTTT
yfmC_B.subtilis	GATAATGATTCTCATTACT
VC0076_V.cholerae	CGAAATGAGAATCAATATT
chuT_E.coli	GATAATCATGATCATTCTC
chuA_E.coli	GATAATAATTCTCATTATA
hmsT_S.typhi	GATAATGATAACCAATATC
hmsT_Y.pestis	GATAATGATAATCATAACC
foxR_S.typhi	GATAATTATTCTCATCTTT
ybtA_Y.pestis	GTGAATAATAACCATTATC
alcR_B.pertussis	GCGAATGAATTGCATTATC
pchR_P.aeruginosa	GATAATATATCTCATTTCC
sodA_S.typhi	GATAATCATTATCAATATC
sodA_V.cholerae	GTTAATGATATTAATTATC
sodA_Y.pestis	GATAATCATTTTCAATATC
feoA_E.coli	AGAAACCATTCTCATTATC
feoA_S.typhi	AGAAACCATTCTCATTATC
feoA_Y.pestis	GTTAATAATTATTATTATC
itpP_Y.pestis	GATAAGTATTATCATTTGC
itsP_Y.pestis	GGTAATAAAAATCATTAGC
fatB_V.cholerae	CTTAATGAGAATAAGTATC
itrA_Y.pestis	GATTTTGATTATCATTTCG
iucA_Y.pestis	GATAATGATAACCACTATT
iucA_E.coli	GATAATGAGAATCATTATT
irp2_Y.pestis	CTTAATAATTATTATTATC
alcY_Y.pestis	ATAAATAATAATCATTTGC

alcA_B.pertussis	CATAATTATTCTCATTAAAT
psaE_Y.pestis	TAAAATCAGTCTCATTTTA
hemN_Y.pestis	GCTTATGATTATCATTTAA
VCA0909_V.cholerae	AATTATCAATTGCATTATC
fhuF_Y.pestis	GCTATTGATAATCACTATC
fhuF_E.coli	GATAATGATAACCAATATC
omrA_Y.pestis	GAAAATGATAATCGTTTGC
omrA_P.aeruginosa	GAGATCGATATGCATTTTC
hasR_Y.pestis	GATTATGATAATCATTATC
hasR_P.aeruginosa	GCAAATGAAAACATTATC
yyyN_Y.pestis	GATAATGAAAATCATTATC
yebN_E.coli	CCAAATGAAAATCGTTATC
ftn_Y.pestis	AATAATGTGAATGATTATC
ftn_E.coli	AAAAATGATAATCAAAAAA
ftn_H.influenzae	GTAAATGATAATAATTGTT
ftn_H.pylori	ATAAATCATAATCATTTTG
VC1573_V.cholerae	GATAATAATTATCATTTAA
fumC_P.aeruginosa	AATAATCAATCTCATTATC
fumC_S.typhi	GATAAAGGTAACGATTTCT
fumC_Y.pestis	AGAAATGCGAATCAATCGC
VCA0625_V.cholerae	ATTATTGATAATAATTATC
irpA_V.cholerae	ACAAATGATAATAATTTGC
irpA_Synechococcus	AAAAATGATTATTATTCTC
VCA0070_V.cholerae	AAGAATAATTATCGTTATT
VCA0824_V.cholerae	TCTTATGCGAATCATTTTC
VCA0232_V.cholerae	ATATATGCGAATCGTTATC
frpB_N.meningitis	AAAAACGATAATCAGCTTT
VCA0227_V.cholerae	CTTAATGAGAATAAGTATC
frpP_N.meningitis	ACTATAGATTATCATTTAT
vibF_V.cholerae	GATAATGATTATTATTAAC
vibH_V.cholerae	AATATTGATTCTCATTTTCG
viuP_V.cholerae	CGAAATGAGAATCAATATT
tonB_V.cholerae	GATAATGCAATTGATAATT
vibA_V.cholerae	TCAAATGAGAATAGTTTTT
VCA0068_V.cholerae	AATAACGATAATTATTCTT
VC1643_V.cholerae	GATAGTGATGATAATTAAC
VCA0988_V.cholerae	GACAACGATAATCACAATC
VCA0923_V.cholerae	TATAAATCAAATCATTATC
VC1403_V.cholerae	GAAAATTTAAATCATTGTC
VC1405_V.cholerae	GACAATGATTTAAATTTTC
tcp1_V.cholerae	GAAAGTAAATCTCATTATA
tcpP_V.cholerae	TATAATGAGAATTACTTTC
tcpJ_V.cholerae	GAATATCATATTCAATTTTC
fliLM_V.cholerae	ACTGTTGATCATCATTATC
gpmA_E.coli	TATAATGAGAATTATTATC
gpmA_S.typhi	TATAATGAGAATTATTATC
gpmA_Y.pestis	TATAATGATAATAATTATC
nupC_E.coli	GAGAATGATTATCAAATTC
nupC_S.typhi	GATAATGATTATCAAGTGC
nupC_Y.pestis	TTAAATGAGAATAATTATC
b2392_E.coli	GAATTTGATAATCATTCTC
NRAMP_S.typhi	GCACTTGATAATCATTATC
NRAMP_Y.pestis	GATAATTATTCTCATTTAA
Fur1_P.putida	TGACAATCATTATCATTCT
FagA_P.aeruginosa	GAAAACAATAATCAATCT
TolQ_P.aeruginosa	GACAAGGCGGTGAATCT

---

Tabela S1. continuação.

**Tabela S2.** CDS reguladas positivamente sob excesso de ferro.

<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>
XF0001	4,14	XF0672	4,29	XF1220	2,99
XF0002	5,28	XF0704	4,86	XF1256	3,29
XF0003	4,23	XF0737	1,43	XF1257	2,2
XF0007	1,85	XF0738	4,2	XF1270	2,08
XF0051	2,17	XF0739	3,1	XF1271	1,57
XF0054	4,08	XF0740	3,66	XF1305	4,35
XF0079	4,26	XF0742	2,28	XF1306	5,58
XF0093	2,01	XF0760	3,71	XF1318	2,13
XF0125	1,75	XF0785	2	XF1350	2,51
XF0138	8,94	XF0794	2,04	XF1360	2,41
XF0142	2,71	XF0803	1,64	XF1369	3,29
XF0155	8,17	XF0804	4,82	XF1383	3,61
XF0172	5,78	XF0807	3,61	XF1391	3,23
XF0180	3,01	XF0809	3,25	XF1488	2,38
XF0198	3,86	XF0839	3,41	XF1490	3,14
XF0216	3,84	XF0891	4,89	XF1493	3,73
XF0225	2,04	XF0893	2,3	XF1502	2,41
XF0240	2,5	XF0895	4,56	XF1514	2,66
XF0261	1,96	XF0896	3,23	XF1522	2,23
XF0262	1,58	XF1028	5,82	XF1588	2,73
XF0263	1,35	XF1036	1,37	XF1609	2,55
XF0276	3,01	XF1053	2,79	XF1610	2,5
XF0293	2,66	XF1055	2,66	XF1640	2,19
XF0310	2,36	XF1056	4,38	XF1657	1,51
XF0317	2,77	XF1105	1,15	XF1664	2,97
XF0318	3,34	XF1108	1,77	XF1665	2,58
XF0326	3,29	XF1144	3,92	XF1668	2,38
XF0340	1,88	XF1157	1,69	XF1714	2,89
XF0345	2,36	XF1158	1,68	XF1726	1,52
XF0370	1,99	XF1159	1,87	XF1754	1,51
XF0371	2,64	XF1160	2,2	XF1755	4,38
XF0372	2,48	XF1161	2,19	XF1789	2,53
XF0405	1,67	XF1163	1,96	XF1790	2,41
XF0441	3,89	XF1164	1,6	XF1791	2,69
XF0446	5,98	XF1165	2,41	XF1793	2,08
XF0449	3,23	XF1166	1,75	XF1798	2,58
XF0531	3,56	XF1172	1,88	XF1843	4,35
XF0535	3,97	XF1173	1,96	XF1864	3,36
XF0537	2,81	XF1176	2,53	XF1871	2,95
XF0570	3,43	XF1177	6,5	XF1872	2,81
XF0593	2,23	XF1178	8,82	XF1874	5,54
XF0602	2,77	XF1184	3,94	XF1891	4,89
XF0609	1,57	XF1192	2,77	XF1903	1,99
XF0612	4,08	XF1198	3,27	XF1904	2
XF0613	7,73	XF1209	1,78	XF1905	2,06
XF0614	6,45	XF1212	2,68	XF1907	6,45
XF0626	4,38	XF1214	1,99	XF1908	2,23
XF0640	3,05	XF1216	3,51	XF1917	1,96
XF0649	2,48	XF1218	2,14	XF1918	8,22
XF0667	1,79	XF1219	2,08	XF1920	8,4

<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>
XF1945	3,89	XF2195	3,94	XF2780	2,11
XF1953	3,27	XF2279	6,36	XF2781	3,39
XF1954	1,77	XF2293	2,77	XF2782	2,43
XF1955	2,66	XF2305	3,61	XFa0001	9,71
XF1966	2,43	XF2309	2,23	XFa0003	2,14
XF2027	3,56	XF2321	2,11	XFa0014	2,22
XF2028	1,53	XF2365	3,25	XFa0016	2,25
XF2032	1,58	XF2377	1,54	XFa0019	3,14
XF2042	1,93	XF2394	1,64	XFa0023	2,14
XF2063	2,73	XF2395	2,31	XFa0024	1,95
XF2067	2,31	XF2474	2,19	XFa0025	2,62
XF2068	2,27	XF2478	3,78	XFa0029	1,64
XF2069	2,77	XF2491	1,83	XFa0031	2,66
XF2071	2,38	XF2527	3,2	XFa0034	1,8
XF2072	6,23	XF2535	2,35	XFa0046	2,35
XF2073	1,58	XF2543	3,23	XFa0047	1,83
XF2078	3,78	XF2611	3,03	XFa0052	2,55
XF2107	1,82	XF2612	2,38	XFa0055	2,13
XF2111	1,99	XF2622	5,94	XFa0058	2,19
XF2129	2,38	XF2684	3,61	XFa0063	2,3
XF2160	1,41	XF2695	2,53	XFa0064	3,81
XF2174	2,17	XF2705	2,83	XFb0002	3,2
XF2177	2,53	XF2774	4,11		

Tabela S2. continuação.

**Tabela S3.** CDS reguladas negativamente sob excesso de ferro.

Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão
XF0026	-9.78	XF0625	-19.03	XF1175	-5.62
XF0074	-3.03	XF0644	-1.52	XF1187	-2.64
XF0082	-2.50	XF0646	-5.58	XF1196	-11.79
XF0083	-3.14	XF0654	-1.78	XF1201	-3.39
XF0109	-2.19	XF0700	-3.97	XF1204	-4.23
XF0110	-3.32	XF0781	-2.50	XF1213	-2.17
XF0113	-2.33	XF0799	-7.46	XF1228	-5.39
XF0152	-16.80	XF0800	-2.73	XF1264	-1.58
XF0165	-2.66	XF0801	-2.03	XF1265	-2.38
XF0167	-2.97	XF0802	-2.60	XF1275	-7.36
XF0177	-6.32	XF0806	-1.61	XF1287	-2.89
XF0181	-11.08	XF0816	-4.99	XF1297	-2.64
XF0185	-8.46	XF0866	-3.53	XF1300	-19.84
XF0196	-2.07	XF0871	-2.89	XF1301	-3.05
XF0197	-2.60	XF0872	-3.58	XF1319	-4.79
XF0212	-1.73	XF0898	-5.24	XF1321	-4.56
XF0231	-2.22	XF0904	-3.25	XF1322	-5.82
XF0232	-1.73	XF0906	-3.86	XF1323	-2.25
XF0238	-1.54	XF0908	-3.68	XF1327	-1.92
XF0253	-4.63	XF0911	-3.20	XF1344	-2.28
XF0256	-2.97	XF0912	-3.48	XF1346	-3.39
XF0274	-13.55	XF0923	-3.43	XF1361	-1.68
XF0283	-3.63	XF0938	-1.64	XF1382	-3.23
XF0286	-8.17	XF0942	-4.17	XF1387	-2.79
XF0287	-3.66	XF0944	-5.06	XF1388	-5.70
XF0290	-11.55	XF0961	-6.32	XF1390	-1.71
XF0319	-3.78	XF0981	-3.10	XF1407	-10.06
XF0367	-3.05	XF0991	-2.33	XF1408	-5.54
XF0381	-3.73	XF0998	-3.18	XF1443	-2.87
XF0382	-2.50	XF1024	-2.62	XF1448	-2.57
XF0388	-3.05	XF1025	-2.27	XF1473	-2.57
XF0395	-2.08	XF1026	-4.69	XF1484	-3.51
XF0396	-4.08	XF1031	-7.01	XF1487	-2.66
XF0397	-3.29	XF1043	-4.06	XF1516	-4.11
XF0434	-2.77	XF1067	-3.94	XF1529	-4.59
XF0453	-2.16	XF1103	-2.64	XF1530	-1.80
XF0457	-1.92	XF1123	-4.92	XF1531	-2.91
XF0550	-9.25	XF1125	-3.32	XF1534	-1.69
XF0557	-5.10	XF1129	-2.83	XF1535	-2.91
XF0561	-3.39	XF1133	-1.64	XF1536	-2.43
XF0565	-2.46	XF1137	-3.12	XF1537	-7.06
XF0568	-12.30	XF1142	-15.67	XF1549	-3.20
XF0580	-2.89	XF1143	-2.43	XF1550	-2.31
XF0589	-4.41	XF1145	-3.36	XF1554	-4.14
XF0592	-2.66	XF1146	-15.35	XF1589	-3.36
XF0596	-2.51	XF1147	-4.06	XF1605	-2.93
XF0599	-4.59	XF1148	-6.45	XF1606	-2.08
XF0603	-2.08	XF1149	-2.20	XF1628	-11.31
XF0615	-32.00	XF1162	-1.62	XF1632	-7.11
XF0616	-32.22	XF1168	-4.00	XF1633	-3.46
XF0624	-8.17	XF1169	-2.06	XF1639	-8.75

Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão
XF1647	-2.68	XF2006	-1.83	XF2517	-2.55
XF1707	-3.94	XF2048	-2.07	XF2542	-1.88
XF1708	-2.06	XF2094	-1.77	XF2544	-3.25
XF1767	-3.63	XF2141	-1.79	XF2547	-5.43
XF1801	-3.78	XF2144	-5.58	XF2548	-3.84
XF1803	-2.13	XF2159	-5.03	XF2579	-1.87
XF1808	-2.22	XF2165	-4.47	XF2596	-3.63
XF1811	-6.28	XF2184	-3.23	XF2603	-2.79
XF1815	-2.08	XF2185	-2.46	XF2609	-3.14
XF1816	-2.27	XF2203	-5.39	XF2629	-3.03
XF1827	-3.56	XF2230	-2.97	XF2633	-1.59
XF1834	-2.79	XF2233	-5.17	XF2634	-1.85
XF1836	-4.03	XF2234	-7.52	XF2635	-3.29
XF1840	-5.39	XF2237	-7.01	XF2638	-1.68
XF1856	-3.36	XF2241	-4.66	XF2641	-2.75
XF1859	-1.95	XF2243	-3.94	XF2642	-1.89
XF1887	-2.58	XF2246	-2.17	XF2648	-3.48
XF1889	-2.35	XF2247	-3.48	XF2675	-4.59
XF1893	-2.01	XF2306	-2.58	XF2686	-1.85
XF1894	-2.36	XF2326	-4.03	XF2699	-2.83
XF1895	-3.05	XF2339	-2.55	XF2700	-3.16
XF1896	-2.20	XF2340	-9.58	XF2701	-2.69
XF1923	-3.14	XF2341	-16.45	XF2747	-3.05
XF1936	-2.66	XF2345	-2.95	XFa0002	-3.46
XF1944	-2.25	XF2354	-5.28	XFa0004	-4.08
XF1948	-1.88	XF2358	-6.59	XFa0005	-5.39
XF1950	-2.13	XF2360	-6.06	XFa0006	-1.77
XF1961	-3.73	XF2423	-1.96	XFa0017	-2.55
XF1970	-6.73	XF2424	-4.41	XFa0036	-2.23
XF1981	-5.39	XF2432	-2.64	XFa0039	-4.03
XF1983	-5.28	XF2438	-2.03	XFa0049	-8.06
XF1985	-2.10	XF2453	-8.40	XFa0050	-4.99
XF1987	-2.01	XF2470	-1.55	XFa0059	-5.24
XF1990	-3.03	XF2510	-2.66		
XF2005	-2.19	XF2514	-3.63		

Tabela S3. continuação.



**Tabela S4.** CDS reguladas positivamente sob carência de ferro.

Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão
XF0002	4,47	XF0676	1,48	XF1482	2,04
XF0025	2,14	XF0692	1,96	XF1514	2,13
XF0031	1,64	XF0704	2,79	XF1530	2,2
XF0038	6,92	XF0759	1,84	XF1533	3,34
XF0045	2,58	XF0762	1,89	XF1538	1,77
XF0050	3,48	XF0779	6,41	XF1588	3,46
XF0069	2,83	XF0785	1,83	XF1598	1,56
XF0089	1,85	XF0804	3,78	XF1623	1,99
XF0121	1,77	XF0882	4,08	XF1640	2,01
XF0125	2,13	XF0891	2,57	XF1645	2,39
XF0155	3,29	XF0893	2,36	XF1657	2,16
XF0166	1,97	XF0895	2,66	XF1658	1,96
XF0172	2,22	XF0918	2,2	XF1662	2,89
XF0188	2,23	XF0932	19,29	XF1664	2,5
XF0216	2,58	XF0933	12,64	XF1693	2,14
XF0223	1,87	XF0934	2,17	XF1694	1,97
XF0227	3,14	XF0935	2,43	XF1703	3,43
XF0235	1,69	XF0952	1,65	XF1726	1,61
XF0260	1,93	XF0972	2,6	XF1755	2,33
XF0261	1,78	XF1028	7,31	XF1756	1,77
XF0262	2,5	XF1041	2,38	XF1784	1,62
XF0264	2,91	XF1055	3,2	XF1786	2,73
XF0291	4,5	XF1056	2,51	XF1787	2,06
XF0294	2,25	XF1069	1,61	XF1788	4,14
XF0310	2,33	XF1084	1,66	XF1793	1,59
XF0318	2,77	XF1108	2,01	XF1821	1,41
XF0320	2,33	XF1117	2,43	XF1831	2,11
XF0348	1,6	XF1118	2,38	XF1832	1,8
XF0364	5,78	XF1150	2,46	XF1843	6,28
XF0371	1,92	XF1153	2,19	XF1849	3,01
XF0394	3,36	XF1159	1,74	XF1864	3,14
XF0402	1,39	XF1164	1,68	XF1886	1,42
XF0420	1,83	XF1171	1,88	XF1903	1,41
XF0446	3,36	XF1172	1,91	XF1904	1,78
XF0500	2,57	XF1217	1,99	XF1907	4,82
XF0508	2,57	XF1226	1,51	XF1923	1,87
XF0531	2,83	XF1255	4,53	XF1941	2,16
XF0535	2,2	XF1256	2,5	XF1950	2,1
XF0545	2,13	XF1270	2,14	XF2043	2,91
XF0551	1,65	XF1292	1,65	XF2063	1,66
XF0553	2,23	XF1318	2,43	XF2071	1,49
XF0587	2,07	XF1354	1,69	XF2072	1,47
XF0597	2,04	XF1360	2,68	XF2074	1,48
XF0599	2,35	XF1368	1,8	XF2078	2,89
XF0600	2,75	XF1373	1,46	XF2129	2,07
XF0602	2,43	XF1374	2,16	XF2155	5,1
XF0640	2,69	XF1379	2,1	XF2166	3,56
XF0655	1,68	XF1423	2,31	XF2174	1,78
XF0666	1,77	XF1452	2,68	XF2177	2,16
XF0667	2,25	XF1474	3,89	XF2182	2,45
XF0672	3,94	XF1477	2,83	XF2195	3,25

<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>
XF2196	1,78	XF2434	1,97	XF2730	3,71
XF2200	2,68	XF2440	3,94	XF2769	1,55
XF2235	1,78	XF2474	3,78	XF2774	4,79
XF2268	2,89	XF2516	2,11	XF2775	5,86
XF2279	4,99	XF2526	2,5	XF2781	2,97
XF2309	1,99	XF2535	2,27	XFa0001	3,56
XF2321	2,71	XF2594	1,55	XFa0018	2,16
XF2330	2,33	XF2597	2,16	XFa0019	1,73
XF2377	1,62	XF2614	1,71	XFa0022	1,73
XF2380	2,68	XF2622	3,16	XFa0023	2,07
XF2394	1,89	XF2684	2,66	XFa0024	2,08
XF2398	2,51	XF2695	1,64	XFa0046	2,31
XF2430	2,41	XF2705	2,41	XFa0063	1,62
XF2434	1,97	XF2715	2,69		

Tabela S4. continuação.

**Tabela S5.** CDS reguladas negativamente sob carência de ferro.

Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão	Gene ID	Máxima razão de expressão
XF0026	-6,02	XF0741	-2,95	XF1320	-1,75
XF0029	-3,81	XF0816	-2,91	XF1321	-1,54
XF0033	-2,35	XF0826	-2,07	XF1322	-3,58
XF0068	-3,03	XF0849	-3,25	XF1346	-2,25
XF0082	-2,50	XF0854	-3,23	XF1382	-1,87
XF0083	-1,60	XF0872	-2,91	XF1399	-3,81
XF0099	-1,29	XF0873	-3,01	XF1405	-2,68
XF0110	-2,62	XF0894	-2,87	XF1407	-2,68
XF0124	-2,87	XF0898	-5,46	XF1408	-5,86
XF0126	-5,98	XF0900	-1,82	XF1472	-2,58
XF0146	-2,22	XF0942	-4,76	XF1484	-2,17
XF0151	-3,56	XF0961	-1,80	XF1517	-1,62
XF0152	-3,18	XF0966	-2,68	XF1520	-2,93
XF0159	-4,06	XF0975	-2,08	XF1529	-4,69
XF0164	-10,70	XF0998	-2,83	XF1535	-2,17
XF0165	-2,28	XF1013	-2,66	XF1605	-2,10
XF0176	-3,32	XF1024	-2,73	XF1628	-3,34
XF0177	-2,68	XF1031	-1,87	XF1632	-2,51
XF0181	-1,92	XF1036	-1,46	XF1639	-2,85
XF0184	-3,92	XF1043	-2,50	XF1648	-5,28
XF0185	-6,54	XF1068	-4,23	XF1708	-2,60
XF0197	-3,43	XF1073	-2,55	XF1717	-2,97
XF0210	-2,28	XF1079	-2,75	XF1801	-2,51
XF0253	-2,31	XF1100	-1,34	XF1811	-1,59
XF0278	-2,11	XF1123	-2,38	XF1815	-1,85
XF0286	-2,64	XF1125	-3,94	XF1816	-1,93
XF0287	-2,25	XF1129	-2,17	XF1826	-2,55
XF0290	-2,45	XF1131	-3,97	XF1836	-2,41
XF0292	-1,64	XF1134	-3,66	XF1840	-2,38
XF0362	-2,14	XF1136	-3,10	XF1854	-2,10
XF0373	-1,60	XF1137	-2,39	XF1856	-1,56
XF0387	-2,85	XF1143	-2,13	XF1867	-2,77
XF0388	-4,03	XF1146	-2,58	XF1875	-3,16
XF0395	-1,99	XF1147	-2,60	XF1881	-6,36
XF0396	-2,64	XF1148	-2,45	XF1884	-3,05
XF0397	-1,67	XF1155	-2,39	XF1887	-1,57
XF0401	-2,85	XF1167	-1,60	XF1889	-4,53
XF0418	-3,20	XF1168	-2,55	XF1894	-1,71
XF0434	-2,93	XF1175	-3,68	XF1944	-1,89
XF0453	-1,65	XF1196	-2,20	XF1953	-2,23
XF0557	-2,04	XF1204	-2,68	XF1970	-4,23
XF0568	-3,03	XF1209	-1,41	XF1981	-2,95
XF0588	-2,77	XF1259	-1,80	XF2001	-2,51
XF0592	-1,75	XF1264	-1,92	XF2013	-1,83
XF0596	-1,89	XF1265	-2,36	XF2022	-3,48
XF0598	-1,21	XF1275	-2,31	XF2036	-1,55
XF0603	-2,93	XF1287	-1,83	XF2053	-1,80
XF0616	-4,20	XF1291	-1,60	XF2094	-1,59
XF0625	-3,39	XF1297	-2,55	XF2100	-1,95
XF0626	-1,84	XF1300	-5,28	XF2102	-3,48
XF0700	-3,46	XF1319	-2,41	XF2127	-1,92

<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Máxima razão de expressão</b>
XF2144	-2,93	XF2424	-1,73	XF2685	-1,74
XF2158	-3,36	XF2428	-2,19	XF2701	-1,85
XF2165	-1,61	XF2438	-1,77	XF2747	-2,64
XF2171	-4,59	XF2450	-1,80	XF2755	-3,58
XF2184	-4,82	XF2451	-3,18	XFa0004	-3,32
XF2197	-3,41	XF2452	-12,55	XFa0005	-4,86
XF2237	-4,89	XF2453	-2,87	XFa0008	-1,80
XF2239	-2,81	XF2454	-4,56	XFa0012	-1,62
XF2241	-3,46	XF2544	-2,38	XFa0017	-2,23
XF2261	-1,96	XF2545	-3,36	XFa0036	-2,25
XF2283	-2,10	XF2547	-2,62	XFa0039	-3,71
XF2326	-1,80	XF2560	-2,62	XFa0042	-2,97
XF2335	-4,76	XF2596	-1,99	XFa0049	-5,17
XF2339	-2,60	XF2628	-1,82	XFa0050	-3,51
XF2340	-3,25	XF2629	-2,64	XFa0051	-2,50
XF2341	-5,35	XF2632	-1,55	XFa0055	-1,67
XF2347	-1,47	XF2633	-1,85	XFa0059	-7,21
XF2359	-2,99	XF2634	-2,23	XFa0060	-2,38
XF2360	-2,69	XF2635	-1,84	XFa0061	-4,76
XF2374	-3,27	XF2640	-1,61	XFa0062	-1,92
XF2402	-2,77	XF2642	-1,53		
XF2421	-1,71	XF2642	-1,53		

Tabela S5. continuação.

**Tabela S6.** CDS previamente hipotéticas que foram reanotadas neste trabalho.

<b>CDS</b>	<b>Função Predita</b>	<b>Score (bits)</b>	<b>e value</b>
XF0121	2-nitropropane dioxygenase	155	4e-37
XF0142	Acyltransferase 3	122	5e-27
XF0167	metallopeptidase	107	2e-22
XF0177	TatD-related deoxyribonuclease	475	e-133
XF0188	NUDIX hydrolase	367	e-100
XF0197	Phospholipid/glycerol acyltransferase	443	e-123
XF0240	DUF24, predicted transcriptional regulator	152	6e-36
XF0278	serine/threonine protein kinase	461	e-129
XF0387	Dihydrouridine synthase, DuS	162	6e-39
XF0394	BFD-like (2Fe-2S)-binding region	125	5e-28
XF0401	GGDEF regulator	155	7e-37
XF0405	HesB/YadR/YfhF	253	3e-66
XF0550	TonB-dependent receptor	112	7e-24
XF0553	LppC putative lipoprotein	157	1e-37
XF0568	Putative exonuclease, RdgC	163	3e-39
XF0592	Aminoglycoside phosphotransferase	150	2e-35
XF0593	DNA transport competence protein	187	1e-46
XF0596	lysozyme	103	3e-21
XF0598	2OG-Fe(II) oxygenase superfamily	458	e-127
XF0600	outer membrane protein UptD precursor	167	1e-40
XF0602	UptF protein	143	2e-33
XF0849	methionine sulfoxide reductase B	336	2e-91
XF0893	hemagglutinin-like secreted protein	166	3e-40
XF0923	Smg protein	165	5e-40
XF0938	Competence lipoprotein ComL	188	2e-46
XF0966	type 4 fimbrial biogenesis protein	322	7e-87
XF1013	metal dependent repressor, DtxR family	175	6e-43
XF1036	TonB-dependent receptor	117	1e-25
XF1068	Glycine cleavage T protein	152	5e-36
XF1079	MotA/TolQ/ExbB proton channel	358	8e-98
XF1198	flavodoxin	330	1e-89
XF1292	cell division protein FtsB	210	2e-53
XF1301	ABC transporter permease	161	1e-38
XF1323	GCN5-related N-acetyltransferase	353	3e-96
XF1382	Ferritin and Dps	337	1e-91
XF1477	FeS assembly protein SufB	146	3e-34
XF1533	Peptidase M22, glycoprotease	437	e-121
XF1714	heat shock protein HSP33	329	3e-89
XF1754	Phage integrase	117	5e-25
XF1894	radical activating enzyme	439	e-122
XF1950	CheW-like protein	305	3e-82
XF2013	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	346	5e-94
XF2237	TonB-dependent receptor	151	1e-35
XF2283	Beta-lactamase-like	114	2e-24
	Glyoxalase/bleomycin resistance		2e-36
XF2305	protein/dioxygenase	154	
XF2347	Oligoketide cyclase/lipid transport protein	115	8e-25
XF2359	Response regulator receiver:Hpt	462	e-129
XF2450	BolA-like protein	170	2e-41
XF2453	pseudouridylate synthase	156	3e-37
XF2491	transcriptional regulator, XRE family	239	2e-62
XF2594	Peptidase M48, Ste24p	155	5e-37

XF2611	two-component system regulatory protein	102	4e-21
XF2715	Transcriptional Regulator, TetR family	171	1e-41
XF2769	hemagglutinin-like secreted protein	121	9e-27
XFa0025	GCN5-related N-acetyltransferase	311	7e-84

---

Tabela S6. continuação. Para evitar imprecisão na tradução para a língua portuguesa mantivemos o nome dos produtos gênicos na língua inglesa.

## **8. ANEXO – Símula Curricular**

## Súmula Curricular

**Nome:** Paulo Adriano Zaini

**Local e data de nascimento:** São Paulo, SP, 07 de novembro de 1978

**Educação:** Colégio João Paulo II, Pouso Alegre, MG, 1997

Universidade de São Paulo, São Paulo, SP:

- Bacharelado em Ciências Biológicas, 2001

- Licenciatura em Ciências Biológicas, 2002

- Doutorado em Bioquímica, atual

**Bolsas:** Iniciação Científica – Fapesp – agosto 1999 a dezembro 2001

Doutorado Direto – Fapesp – março de 2002 a dezembro de 2006

### Publicações:

1. Zaini PA, Lupo FGN, Nakaya HI, Vencio RZ, Da Silva AM (2007) The iron regulon of *Xylella fastidiosa* includes genes for type-IV pilus and colicin V-like bacteriocins. Submetido ao J. Bacteriology.
2. Pashalidis S<sup>1</sup>, Moreira LM<sup>1</sup>, Zaini PA<sup>1</sup>, Campanharo JC, Alves LM, Ciapina LP, Vencio RZ, Lemos EG, Da Silva AM, Da Silva AC (2005) Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. OMICS. Spring;9(1):77-90.
3. Koide T<sup>1</sup>, Zaini PA<sup>1</sup>, Moreira LM, Vencio RZ, Matsukuma AY, Durham AM, Teixeira DC, El-Dorry H, Monteiro PB, da Silva AC, Verjovski-Almeida S, da Silva AM, Gomes SL (2004) DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. J Bacteriol. 186(16):5442-9.
4. Andrioli LP, Zaini PA, Viviani W, Da Silva AM (2003) *Dictyostelium discoideum* protein phosphatase-1 catalytic subunit exhibits distinct biochemical properties. Biochem J. 373(Pt 3):703-11.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)