

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**ANA PAULA SILVA DE SOUZA**

**Caracterização bioquímica e funcional da proteína**  
***XadA3 de *Xylella fastidiosa****

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**15/03/2018**

ANA PAULA SILVA DE SOUZA

**Caracterização bioquímica e funcional da proteína  
XadA3 de *Xylella fastidiosa***

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

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S719c Souza, Ana Paula Silva de  
Caracterização bioquímica e funcional da proteína XadA3 de Xylella fastidiosa / Ana Paula Silva de Souza. - São Paulo, 2018.  
133 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: da Silva, Aline Maria

1. Fitopatógeno. 2. Xylella fastidiosa. 3. virulência. 4. adesinas. 5. autotransportador trimérico. I. T. II. da Silva, Aline Maria, orientador.

Em Branco

*Dedico este trabalho ao meu pai, José... que se tornou um anjo nesta trajetória, à minha mãe Lia, ao meu marido João Batista e aos meus amados “pets” James, Kirk, Lolo (anjinhos) e Eddie.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Aline Maria da Silva por me aceitar em seu grupo de pesquisa e por seu apoio científico e pessoal durante todo meu Doutorado.

Ao Dr. Paulo Adriano Zaini pelas valiosas sugestões na condução desse projeto, por me auxiliar em vários experimentos, principalmente nos ensaios utilizando câmaras de microfluídica, e pelo constante suporte.

Ao Prof. Steven Lindow, ao Dr. Michael Ionescu e a Dra. Clelia Baccari da Universidade da Califórnia em Berkeley (EUA) pela colaboração na geração das cepas mutantes de *Xylella fastidiosa* e nos ensaios de virulência em videiras e de transmissão inseto-planta.

Aos colegas de laboratório Drs. Paulo Marques Pierry e Oséias Rodrigues Feitosa Junior pela imprescindível colaboração em alguns experimentos e sugestões ao projeto e, sobretudo, pela amizade.

À Dra. Cecília Mari Abe do Instituto Butantan pela gentileza e disposição para me ensinar a preparar amostras para realização da microscopia eletrônica de transmissão, e por ceder telas e reagentes para imunomarcagem com ouro.

À Dra. Layla Farage Martins, especialista responsável pelo Centro Avançado de Tecnologias em Genômica (CATG), pela ajuda nos experimentos de RNA-seq e também pela sua amizade.

Ao Alexandre Sanchez, grande amigo e técnico de nosso laboratório, pelo cuidado e presteza no preparo de meios de cultura e manutenção geral do laboratório.

A Dóris Dias Araújo, auxiliar técnica em nosso laboratório, e demais funcionários dos laboratórios em que frequentei no Departamento de Bioquímica, pelos ótimos serviços prestados.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório, Joice Cassimiro, Dr. Deibs Barbosa, Raquel Riyuzo, Dra. Roberta Verciano, Dra. Luciana Antunes, Dr. Joaquim Martins, Ms. Fernando Tria, Ms. Gustavo Chaves e Ms. Rodrigo Duarte pelas sugestões nos experimentos e pela companhia durante os anos de Doutorado.

Ao colega de laboratório Ms. Deyvid Amgarten pelo convite para auxiliar na caracterização de bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão e pelo reconhecimento dessa colaboração no artigo publicado.

Aos demais colegas da pós-graduação do Programa de Bioquímica do IQ-USP pela troca de experiências científicas e pessoais, e principalmente pelo apoio em horas difíceis.

Aos Profs. Drs. Sergio Verjovski-Almeida, Eduardo Reis, Walter Terra, Clélia Ferreira, Suely Lopes Gomes, Regina Baldini, Bettina Malnic, Chuck Farah, Frederico Gueiros Filho e Glaucia Mendes Souza por possibilitarem acesso a equipamentos e reagentes importantes na realização de determinados experimentos.

A Dra. Alessandra Alves de Souza pela gentileza em nos ceder os anticorpos anti-XadA1 e anti-XadA2.

A todos os professores que tive contato em disciplinas e seminários, no Instituto de Química e em outros Institutos da Universidade de São Paulo, pelas oportunidades de aprimoramento científico e intelectual.

Aos funcionários do IQUSP, em particular da secretaria da Pós-Graduação, por proporcionarem um ambiente agradável de trabalho e aos ótimos serviços prestados.

Aos meus amigos de fora da USP, por todo o apoio, interesse e atenção durante o período de meu Doutorado.

Ao meu esposo João, por ser companheiro, compreensivo, paciente e por todo apoio, carinho e amor em todos os momentos da longa e atribulada trajetória para realizar o Doutorado.

Aos meus pais, José e Lia, ao meu irmão Sandro, aos meus sobrinhos Gabi e Biel e família por me proporcionarem todo o suporte para que eu pudesse me dedicar inteiramente ao Doutorado, por acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado me dando amor, apoio e carinho.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro à pesquisa realizada em nosso laboratório.

À FAPESP pela concessão da bolsa de Doutorado Direto (Processos 2011/15217-0 e 2014/03617-1).

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*Marthin Luther King*

## RESUMO

Souza, Ana Paula Silva de. Caracterização bioquímica e funcional da proteína XadA3 de *Xylella fastidiosa*. 2018. 133 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A adesão é um mecanismo de virulência amplamente conservado entre bactérias Gram-negativas e é utilizado por diversos patógenos para colonizar seus hospedeiros, sendo o primeiro passo do processo de desenvolvimento do biofilme. Uma variedade de apêndices celulares e proteínas está envolvida na adesão bacteriana, tais como *pili*, fimbrias, adesinas fimbriais e afimbriais. O fitopatógeno *Xylella fastidiosa*, agente causal de importantes doenças como a doença de Pierce de videiras, a clorose variegada dos citros e a síndrome do rápido declínio de oliveiras, possui em sua superfície várias dessas estruturas que são potencialmente responsáveis pela colonização eficiente de insetos-vetores e plantas hospedeiras. Entre as adesinas afimbriais codificadas no genoma dessa bactéria, três XadA (XadA1, Hsf/XadA2 e XadA3) são classificadas como autotransportadores triméricos. Dados da literatura sugerem que XadA1 e XadA2 são importantes para a formação do biofilme, porém a função de XadA3 ainda não havia sido investigada. Nesse trabalho, tivemos como objetivo caracterizar bioquímica e funcionalmente a proteína XadA3 e obter informações adicionais sobre o papel desempenhado por XadA1 e XadA2 na adesão e virulência de *X. fastidiosa*. Utilizando imunodeteção com um anticorpo policlonal anti-XadA3 por nós obtido, demonstramos que essa proteína localiza-se na superfície bacteriana e medeia a adesão intercelular. A caracterização dos fenótipos de mutantes de deleção de cada um dos genes das adesinas XadA revelou que o mutante  $\Delta xadA3$  tem reduzida capacidade de agregação celular e formação de biofilme quando comparado tanto aos mutantes  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$  como à cepa selvagem Temecula. A deleção dos genes *xadA* afeta marginalmente o perfil de expressão gênica global avaliado através de RNA-seq das cepas mutantes comparativamente à cepa selvagem, porém destaca-se, nas cepas mutantes, o aumento nos níveis dos transcritos de lipases/esterases. Já foi descrito que essas enzimas parecem atuar na degradação do tecido vegetal associada aos sintomas da doença de Pierce de videiras. A deleção de *xadA3* resulta em um fenótipo de hipervirulência em videiras, mas também de deficiência de transmissão pelo inseto-vetor. O conjunto dos resultados obtidos nesse trabalho evidenciam o importante papel desempenhado pelas adesinas XadAs, particularmente XadA3, na adesão intercelular, no desenvolvimento do biofilme e na virulência de *X. fastidiosa*.

**Palavras-chave:** XadAs, autotransportadores triméricos, adesinas, fitopatógeno, *Xylella fastidiosa*, biofilme, virulência.

## ABSTRACT

Souza, Ana Paula Silva de. Biochemistry and functional characterization of *Xylella fastidiosa* XadA3 adhesin. 2018. 133 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo.

Adhesion is a widely conserved mechanism of virulence among Gram-negative bacteria that is used by several pathogens to colonize their hosts, being the first step in biofilm development. A variety of appendages and proteins are involved in bacterial adhesion, such as pili, fimbriae, fimbrial and afimbrials adhesins. The phytopathogen *Xylella fastidiosa*, causal agent of important diseases such as Pierce's disease of grapevines, citrus variegated chlorosis and olive quick decline syndrome, harbours on its surface several of these structures that are potentially responsible for efficient colonization of insect vectors and plant hosts. Among the afimbrial adhesins encoded in the genome of this bacterium, three XadAs (XadA1, Hsf/XadA2 and XadA3) are classified as trimeric autotransporters. Data from the literature suggest that XadA1 and XadA2 are important for biofilm formation, but XadA3 function has not been yet investigated. In this work, we aimed to biochemically and functionally characterize the XadA3 protein and gather additional information about the role played by XadA1 and XadA2 in *X. fastidiosa* adhesion and virulence. Using immunodetection with a polyclonal anti-XadA3 antibody, we have demonstrated that this protein localizes to the bacterial surface and mediates intercellular adhesion. Phenotypic characterization of the deletion mutants of XadA adhesins encoded genes revealed that the  $\Delta xadA3$  mutant has reduced cell aggregation capacity and biofilm formation when compared to both  $\Delta xadA1$  and  $\Delta xadA2$  mutants as well as to Temecula wild type strain. Deletion of the *xadA* genes marginally affects the global gene expression profile assessed by RNA-seq of the mutant strains compared to the wild-type strain, eventhough an increase in lipase/esterase transcripts levels was observed in the mutant strains. It has been reported that these enzymes appear to participate in the degradation of plant tissue that is associated with symptoms of Pierce's disease of grapevines. The deletion of *xadA3* results in a phenotype of hypervirulence in grapevines but also of deficiency in insect-vector transmission. The results obtained in this work evidenced the important role played by XadAs adhesins, particularly XadA3, in *X. fastidiosa* intercellular adhesion, biofilm development and virulence.

**Keywords:** XadAs, trimeric autotransporters, adhesins, *Xylella fastidiosa*, phytopathogen, biofilm, virulence

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: *ATP binding protein*  
Abs: absorvância  
ALS: escaldadura da folha de amendoeira  
ATP: adenosina trifosfato  
BCYE: *buffered charcoal yeast extract*  
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*  
BSA: albumina de soro bovino  
CATG: Centro Avançado de Tecnologias em Genômica do IQ-USP  
c-di-GMP: monofosfato cíclico de di-guanosina  
cAMP: monofosfato cíclico de adenosina  
cDNA: DNA complementar  
CDS: sequência codificadora  
Clp: *cAMP receptor-like protein*  
CLS: escaldadura da folha de cafeeiro  
CVC: clorose variegada dos citros  
CWDE: enzima degradadora de parede celular  
DEPC: dicarbonato de dietila  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DNase: desoxirribonuclease  
dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato  
DO: densidade ótica  
DSF: *diffusible signaling factor*, fator de sinalização difusível  
DEseq2: *Differential expression analysis for sequence count data 2*  
DTT: Ditioneitol  
DUF: *domain of unknown function*  
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético  
EFSA: European Food Safety Authority  
EPS: exopolissacarídeo  
FDR: *False discovery rate*  
FPKM: *fragments per kilobase transcript per million mapped reads*  
FT: fração não adsorvida à coluna  
FUNDECITRUS: Fundo de Defesa da Citricultura  
IMG/M ER: *Integrated Microbial Genomes-Expert Review*  
IM: *inner membrane*  
IQ-USP: Instituto de Química da Universidade de São Paulo  
KEGG: *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*  
LPS: lipopolissacarídeo  
MeOH: Metanol  
MET: microscopia eletrônica de transmissão  
MEV: microscopia eletrônica de varredura  
mRNA: RNA mensageiro  
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*  
NEB: *New England Biolabs*  
NTA: *nanoparticle tracking analysis* análise de rastreamento de nanopartículas  
OM: *outer membrane*  
OMP: *outer membrane protein*

OMV: *outer membrane vesicle*, vesícula de membrana externa  
OQDS: síndrome do rápido declínio das oliveiras  
padj: *p* valor ajustado  
pb: pares de base  
PBS: *phosphate-buffered saline*  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PD: doença de Pierce  
PE: paired-end  
PW: Periwinkle Wilt  
qPCR: PCR quantitativo  
RBS: *ribosome binding site*  
RIN: *RNA Integrity Number*  
RNA: ácido ribonucleico  
RNase: ribonuclease  
RNA-seq: *RNA sequencing*  
Rpf: *regulation of pathogenicity factors*  
rpm: rotações por minuto  
rRNA: RNA ribossomal  
RT-qPCR: qPCR precedida de transcrição reversa  
RTX: *repeats-in-toxin*  
qPCR: PCR quantitativa  
SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*  
Sec: *general secretory pathway*  
TAA: *trimeric autotransporter adhesion*, adesina autotransportadora trimérica  
Tat: *twin arginine translocation pathway*  
TCA: ácido tricloroacético  
TE: tampão Tris contendo EDTA  
TF: fator de transcrição  
Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano  
T<sub>m</sub>: *melting temperature*  
T0SS: *type 0 secretion system*  
T1SS: *type 1 secretion system*  
T2SS: *type 2 secretion system*  
T3SS: *type 3 secretion system*  
T4SS: *type 4 secretion system*  
T5SS: *type 5 secretion system*  
T6SS: *type 6 secretion system*  
T7SS: *type 7 secretion system*  
T8SS: *type 8 secretion system*  
T9SS: *type 9 secretion system*  
UFC: unidades formadoras de colônia  
UFP: *unknown function protein*  
UV: ultravioleta  
xg: força centrífuga, vezes maior que a força gravitacional da Terra  
WT: *wild type*, cepa selvagem  
XadA: *Xanthomonas adhesin A*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>16</b>
1.1	Adesão bacteriana	16
1.2	Sistemas de Secreção	17
1.2.1	T5SS - Sistema de secreção do tipo V	19
1.3	<i>Xylella fastidiosa</i>	22
1.4	Fatores de adesão de <i>X. fastidiosa</i>	26
1.4.1	Adesinas fimbriais	27
1.4.2	Goma fastidiana	29
1.4.3	Adesinas afimbriais	29
1.4.4	Adesinas autotransportadoras XatA	30
1.4.5	Adesinas autotransportadoras triméricas	30
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Procedimentos Experimentais</b>	<b>34</b>
3.1	Cultivo e manutenção de cepas de <i>Xylella fastidiosa</i>	34
3.2	Deleção de <i>xadA1</i> , <i>xadA2</i> e <i>xadA3</i> por recombinação homóloga	35
3.3	Curva de crescimento de <i>X. fastidiosa</i>	37
3.4	Ensaio de Aglutinação	38
3.5	Ensaio de formação de biofilme	38
3.6	Motilidade celular	39
3.7	Ensaio de adesão em condições de fluxo em câmaras de microfluídica	39
3.8	Quantificação da produção e isolamento de vesículas de membrana externa (OMVs)	40
3.9	Preparo de extratos proteicos de células de <i>X. fastidiosa</i>	42
3.10	Dosagem de proteínas por Bradford	42
3.11	Extração e purificação de DNA total de <i>X. fastidiosa</i>	42
3.12	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
3.13	Eletroforese de DNA em gel de agarose	44
3.14	Clonagem de <i>xadA3</i> de <i>X. fastidiosa</i> em vetor de expressão	44
3.15	Preparo de bactérias competentes e transformação por choque térmico	46
3.16	Preparação de plasmídeos	47
3.17	Sequenciamento automatizado de DNA	48
3.18	Expressão de proteína recombinante	49
3.19	Purificação de XadA3 recombinante por cromatografia de afinidade	50
3.20	Preparação de anticorpos anti-XadA3 em coelho	50

3.21	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	52
3.22	Transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e imunodeteção de proteínas ( <i>Immunoblotting</i> ) .....	52
3.23	Imunomarcagem com partícula de ouro ( <i>Immunogold</i> ).....	53
3.24	Extração e quantificação de RNA total .....	54
3.25	Tratamento do RNA total com DNase .....	56
3.26	PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR).....	56
3.27	Preparação da biblioteca de cDNA para sequenciamento (RNA-Seq).....	58
3.28	Eletroforese capilar utilizando BioAnalyzer .....	61
3.29	Quantificação da biblioteca usando qPCR absoluto .....	62
3.30	Sequenciamento das bibliotecas de cDNA no equipamento <i>MiSeq</i> .....	62
3.31	Análises de dados de RNA-seq.....	63
3.32	Análises bioinformáticas.....	64
3.33	Colonização de plantas com <i>X. fastidiosa</i> e transmissão pelo inseto-vetor .....	65
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>66</b>
4.1	Adesinas da família dos auto-transportadores triméricos em <i>X. fastidiosa</i> .....	66
4.2	A adesina XadA3 em diferentes cepas de <i>X. fastidiosa</i> .....	69
4.3	Determinação da localização subcelular de XadA3 .....	74
4.4	Avaliação do efeito do anticorpo anti-XadA3 e de OMVs na adesão de <i>X. fastidiosa</i> sob condições de fluxo.....	76
4.4.1	Anticorpo anti-XadA3.....	76
4.4.2	Vesículas de membrana externa (OMVs) .....	77
4.5	Caracterização fenotípica dos mutantes $\Delta xadA1$ , $\Delta xadA2$ e $\Delta xadA3$ .....	78
4.5.1	Confirmação da deleção dos genes <i>xadA1</i> , <i>xadA2</i> e <i>xadA3</i> .....	79
4.5.2	Capacidade de formação de biofilme em vidro e plástico.....	81
4.5.3	Ensaio de Aglutinação .....	83
4.5.4	Motilidade celular.....	85
4.5.5	Adesão à superfície sob condições de fluxo .....	86
4.5.6	Produção de OMVs .....	87
4.5.7	Perfil de expressão gênica global.....	89
4.5.8	Virulência em videiras e transmissão inseto-plantas .....	94
<b>5</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Apêndice .....</b>	<b>112</b>
7.1	Alinhamento múltiplo das sequências de XadA3 de cepas de <i>X. fastidiosa</i> .....	112

7.2	Resequenciamento de segmentos de <i>xadA3</i> das cepas 3124, Pr8x e Hib4 .....	121
7.3	Obtenção do anticorpo Anti-XadA3 .....	123
7.3.1	Clonagem de <i>xadA3</i> .....	123
7.3.2	Expressão e purificação de XadA3 recombinante .....	128
7.3.3	Análise da Produção de anticorpos anti-XadA3 .....	130
<b>8</b>	<b>SÚMULA CURRICULAR .....</b>	<b>i</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Adesão bacteriana

Bactérias possuem diversas moléculas adesivas em suas superfícies, que possibilitam sua adesão em superfícies bióticas ou abióticas, uma característica crucial para ocorrer interação com outros organismos e para sobreviverem em ambientes complexos (Berne *et al.*, 2015).

A adesão é um mecanismo de virulência amplamente conservado entre bactérias Gram-negativas sendo utilizada por diversos agentes patogênicos para colonizar seus hospedeiros, sendo o primeiro passo do processo de colonização e desenvolvimento do biofilme. Nesse processo ocorre a produção de expolissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular, que formam a matriz do biofilme e envolve os microrganismos. A composição do biofilme depende das espécies bacterianas envolvidas na sua formação. O desenvolvimento do biofilme pode ser dividido em cinco estágios: (i) adesão reversível (ii) adesão irreversível (iii) início da maturação (iv) biofilme maduro e (v) dispersão. Uma seleção de genes é expressa em cada fase do biofilme (Caserta *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2017).

O biofilme proporciona para as células diversas vantagens, como distribuição de nutrientes, proteção do nicho ecológico, defesa contra forças de cisalhamento e de estresses hidrodinâmicos, proteção contra fagocitose e tolerância a agentes antimicrobianos (Jefferson, 2004; Kumar *et al.*, 2017). As bactérias coordenam o desenvolvimento do biofilme através do sistema *quorum sensing* que utiliza diversas moléculas, incluindo o segundo mensageiro c-di-GMP (monofosfato cíclico de di-guanosina), para controlar e manter a densidade ótima celular requerida para a virulência (Kumar *et al.*, 2017).

Adesinas desempenham papéis fundamentais durante os ciclos de vida de bactérias patogênicas e comensais, uma vez que a adesão é crucial para interações com hospedeiros e outros organismos, proliferação e persistência no meio ambiente. Por exemplo, sem adesão às superfícies, fitobactérias (patogênicas ou não) seriam facilmente removidas dos tecidos vegetais e estruturas abióticas, como os tubos de irrigação. Além disso, a adesão a outras células é de fundamental importância para eficiente colonização do hospedeiro (Boch, 2001; Zaini *et al.*, 2016). As estruturas fimbriais também participam de outros processos importantes, além da adesão propriamente dita, incluindo a transferência de DNA e a motilidade celular. Postula-

se que a caracterização dos papéis desempenhados por proteínas e estruturas celulares envolvidas nos processos de adesão, particularmente nas interações entre bactérias e plantas hospedeiras, pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias para controlar doenças de plantas (Tuson & Weibel, 2013; Zaini *et al.*, 2016).

## 1.2 Sistemas de Secreção

Em bactérias, a secreção de proteínas desempenha um papel essencial na aquisição de nutrientes, sobrevivência e adaptação a diferentes ambientes, comunicação inter e intraspécie, e virulência. Em bactérias Gram-negativas, proteínas destinadas a secreção devem atravessar suas duas membranas: a membrana citoplasmática ou membrana (IM) e a membrana externa (OM). Para contornar a dificuldade de transportar uma variedade diversa de proteínas do citoplasma para o espaço extracelular, as bactérias evoluíram uma impressionante variedade de caminhos de secreção especializados. Essas vias utilizam diversas máquinas de transporte que variam muito em sua complexidade e mecanismo de transporte. (Dautin & Bernstein, 2007). Atualmente, são considerados dez tipos de sistemas de secreção.

O T1SS (sistema de secreção do tipo 1) assemelha-se aos transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*), que exportam pequenas moléculas, antibióticos e toxinas para fora da célula (Green & Mecsas, 2016). A estrutura essencial é composta por uma proteína ABC na membrana interna, uma proteína de fusão de membrana que atravessa a membrana interna e faz a ponte com a proteína de membrana externa. Os substratos do T1SS podem ser proteases, lipases, adesinas e toxinas do tipo RTX, entre outros, e geralmente contém uma sequência C-terminal sinal que não é clivada (Green & Mecsas, 2016).

O T2SS é um sistema muito conservado em bactérias Gram-negativas e importante para os patógenos bacterianos, pois possuem a capacidade de secretar uma gama de substratos para fora da célula bacteriana, contribuindo assim para a virulência. As proteínas são secretadas para o periplasma via sistemas Sec ou Tat, enoveladas no periplasma e então exportadas pelo T2SS (Chagnot *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017).

Desde sua descoberta, o T3SS tem sido identificado em diversos patógenos de mamíferos e de plantas, onde é essencial para a virulência e na determinação de

especificidade do hospedeiro vegetal. Este sistema também é denominado como *injectisome*, devido sua estrutura ser semelhante a uma seringa ou agulha (Henderson *et al.*, 2004; Green & Mecsas, 2016). Essa maquinaria especializada promove a transferência de proteínas efetoras bacterianas do citoplasma diretamente para as células eucarióticas alvos. Dentro dos hospedeiros esses efetores modulam ou subvertem específicas funções celulares, promovendo assim a invasão bacteriana e colonização (Costa *et al.*, 2015).

O T4SS é utilizado para translocação de DNA ou proteínas de bactérias para células receptoras de plantas ou animais, bem como em leveduras e outras bactérias (Tseng *et al.*, 2009). O seu papel mais comum é mediar a conjugação de DNA plasmídico. Assim, esses sistemas contribuem para a propagação de genes de resistência a antibióticos transmitidos por plasmídeos (Costa *et al.*, 2015). Em *Xanthomonas citri*, foi demonstrado que o T4SS tem a capacidade de secretar fatores que resultam na morte de espécies de bactérias Gram-negativas em uma maneira dependente de contato, e postula-se que tem um papel importante nas interações entre bactérias (Souza *et al.*, 2015).

O T5SS está descrito em detalhe no item 1.2.1.

Os T6SS translocam proteínas para uma variedade de células receptoras, incluindo células eucarióticas alvos e, mais comumente, outras bactérias. Estes sistemas são bastante bem conservados em uma ampla gama de espécies bacterianas Gram-negativas, com quase um quarto dos genomas sequenciados contendo genes para componentes T6SS. Eles são capazes de transportar proteínas efetoras de uma bactéria para outra de maneira dependente do contato, o que acredita desempenhar um papel na comunicação bacteriana e nas interações no meio ambiente. Em várias bactérias patogênicas de plantas, os dados são consistentes com o envolvimento do T6SS na inibição do crescimento dependente do contato, ao invés de patogênese (Chang *et al.*, 2014).

T7SS vem sendo somente caracterizado em bactérias Gram-positivas, porque este sistema foi somente encontrado em membros das famílias *Mycobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* e *Nocardiaceae* (Tseng *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014).

T8SS corresponde a *via extracellular nucleation-precipitation* (ENP), envolvido na secreção de membrana externa e montagem de um fino e agregativo pili, chamado *curli* e encontrado em *E. coli*. *Curli* são fibras amiloides que estão

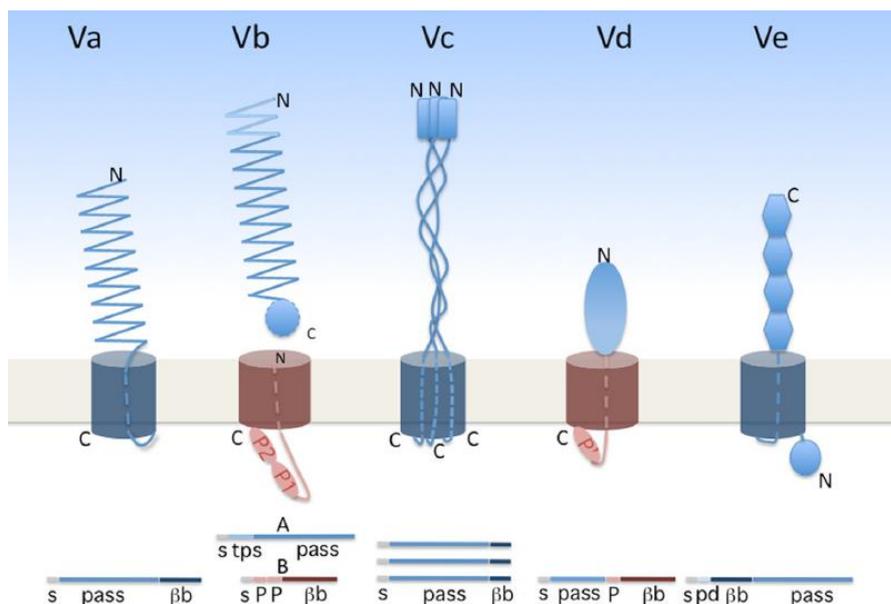
envolvidas em agregação celular, adesão bacteriana e formação de biofilme maduro (Blanco *et al.*, 2012; Chagnot *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2014).

O T9SS, antes chamado de Por foi caracterizado apenas recentemente em algumas espécies do filo Bacteroidetes. As proteínas destinadas a secreção via T9SS possuem um domínio C-terminal conservado que as dirigem para o aparato de translocação localizado na OM. Após a translocação através da OM, o domínio C-terminal é clivado por uma protease e um lipopolissacarídeo (LPS) aniônico é ligado ao novo C-terminal, e dessa forma a proteína pode ser mantida associada à superfície celular ou secretada para o meio extracelular (Li, 2017).

O sistema de secreção do tipo zero (T0SS), recentemente incluído entre os sistemas de secreção, representa as vesículas de membrana externa, um mecanismo amplamente difundido entre as bactérias Gram-negativas (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017). Vesículas de membrana externa (OMVs, *outer membrane vesicles*) de bactérias Gram-negativas são conhecidas desde 1967, quando foram descritas como “sacos de membrana” produzidos por *Vibrio cholerae* (Chatterjee & Das, 1967). Atualmente, as OMVs são descritas como nanopartículas com tamanho entre 30-300 nm que possuem alguma função característica e são produzidas por praticamente todas espécies de Gram-negativas (Bonnington & Kuehn, 2014).

### 1.2.1 T5SS - Sistema de secreção do tipo V

T5SS se refere a proteínas dependentes da maquinaria Sec para transitar a membrana interna, depois ser transportada através da membrana externa, por uma unidade de translocação, formada por um barril beta para finalizar a completa secreção. Sua composição elementar é formada por uma região N-terminal contendo um peptídeo sinal, seguida de um domínio de passagem e finalizando em um beta barril na região C-terminal. Esta via é dividida em 5 subtipos (Figura 1) (Henderson *et al.*, 2004; Chagnot *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2016).



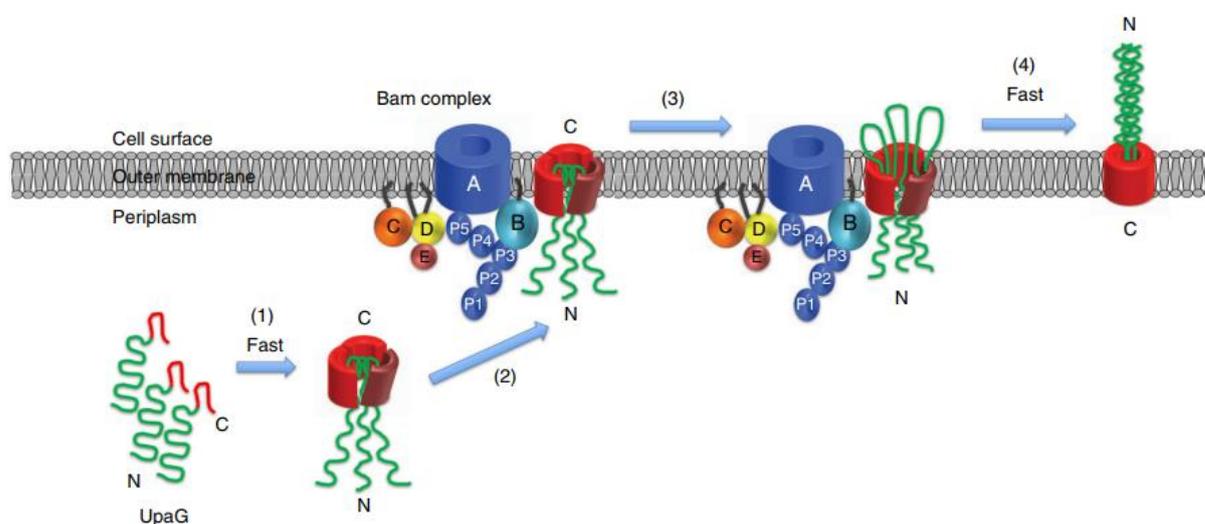
**Figura 1. Organização estrutural dos subtipos de sistemas de secreção do tipo V.** O barril beta em azul indica ter 12 folhas beta e o em vermelho, ter 16 folhas beta. P1, P2 e P' correspondem ao domínio POTRA. s, peptídeo sinal; pass, domínio de passagem; bb, domínio barril beta; tps, domínio TPS de proteínas TpsA; pd, domínio periplasmático do Tipo Ve. Figura retirada de (Guérin *et al.*, 2017).

O tipo Va é o clássico autotransportador, sendo a protease IgA1, o primeiro descrito em *Neisseria gonorrhoeae*. Em muitos casos, incluindo a IgA1, o domínio de passagem é clivado por um processo autocatalítico após a completa translocação, liberando o domínio de passagem para o meio extracelular, mas deixando o domínio de translocação na membrana externa. Contudo o tipo Vb parece uma variação do tipo Va, o domínio de passagem (TpSA) e o de translocação (TpSB) são duas proteínas separadas, porém são expressas no mesmo operon (TpS) (Fan *et al.*, 2016).

O tipo Vc é o provavelmente mais complexo dos 5 tipos, pois são obrigatoriamente trímeros, o que levou ao nome adesinas autotransportadoras triméricas (TAAs). Esta classe de adesinas apresenta o domínio de passagem, composto pelos domínios: cabeça, pescoço e cauda, este último um domínio do tipo *coiled-coil*, além de uma sequência sinal de secreção N-terminal (Nummelin *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2010). Este domínio é altamente diverso e modular, sendo responsável pela adesividade específica e outras atividades como a manutenção da arquitetura modular da célula. O domínio de passagem é externalizado enquanto o domínio de ancoragem (estrutura barril-beta) permanece

embebido na membrana externa, sendo que a homotrimerização é importante no processo de localização celular das adesinas TAA, que ocorre, na maioria dos exemplos já descritos, sem o envolvimento de proteínas auxiliares. Contudo, já o domínio de translocação (C-terminal) é altamente conservado, sendo o único a ser oligomérico (da Silva *et al.*, 2001; Linke *et al.*, 2006; Lyskowski *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos descritos na literatura (Sikdar *et al.*, 2017), sugerem um novo modelo de montagem (biogênese) dos TAAs (Figura 2), sendo depois que a proteína é translocada para o periplasma, 3 subunidades rapidamente formam um trímero assimétrico, onde 2 subunidades assumem uma determinada estrutura conformacional (passo 1). Subseqüentemente, este trímero intermediário é alvo do complexo Bam e é integrado na membrana externa (passo 2). A iniciação da translocação do domínio de passagem é então desencadeada por uma transição relativamente lenta (passo 3). Depois que o domínio de passagem é rapidamente translocado através da membrana externa, o barril beta colapsa em uma estrutura resistente ao calor e ao SDS (passo 4) (Sikdar *et al.*, 2017).



**Figura 2. Modelo de montagem de uma adesina autotransportadora trimérica.** Esquema retirado de (Sikdar *et al.*, 2017).

Apesar da denominação autotransportador, estudos recentes tem mostrado que existem proteínas e/ou complexos proteicos envolvidos na biogênese dessas adesinas triméricas (Grin *et al.*, 2014). Neste processo, no periplasma ainda ocorre a

presença de outras proteínas, chaperonas periplasmáticas SurA (ou Hbp) e Skp e a chaperona /protease DegP, que estão envolvidas no controle de qualidade, degradando qualquer proteína desenovelada (Leo *et al.*, 2012).

O tipo Vd é uma descoberta recente e possui poucos exemplos estudados até o momento. São em geral semelhantes ao tipo Va, entretanto o domínio translocador C-terminal e o domínio de passagem N-terminal são conectados através de um domínio periplasmático adicional, homólogo aos domínios periplásmicos do poro de translocação do tipo Vb (Fan *et al.*, 2016).

Adicionalmente, o tipo Ve, também denominado de *inverse autotransporters*, baseando-se no fato que a ordem dos domínios é inversa, onde o C-terminal compreende o domínio de passagem e a região N-terminal forma o poro de translocação. Os domínios de passagem são tipicamente *Ig-like* e *lectina-like*, que não são encontrados em outros sistemas de secreção do tipo V, mas são abundantes em adesinas de bactérias Gram-positivas. Pequenos domínios periplasmáticos, podendo conter motivos de ligação a peptidoglicano estão presentes na região N-terminal da cadeia polipeptídica (Lyskowski *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2016).

### 1.3 *Xylella fastidiosa*

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa, não-flagelada, que forma colônias circulares com bordas lisas ou rugosas, com formato de de 0,25 e 0,50 µm diâmetro e comprimento entre 1,0 a 4,0 bastonete. Seu crescimento no cultivo *in vitro* é lento, com tempo de duplicação que varia entre 9 e 55 horas, dependendo do meio de cultivo. A sua temperatura ótima de crescimento *in vitro* é entre 26°C-28°C (Davis *et al.*, 1978; Davis *et al.*, 1981a; Wells *et al.*, 1987; Hopkins, 1989; Almeida & Nunney, 2015).

Este fitopatógeno coloniza o xilema de diversas espécies vegetais e também o aparelho bucal do seu vetor, as cigarrinhas (insetos da família Cicadellidae), pelo qual é transmitida às plantas hospedeiras. Estes insetos se alimentam do fluido que percorre o xilema da planta e são infectados ao se alimentarem da seiva de plantas contaminadas. As bactérias ficam restritas à parte anterior do intestino do inseto, aderidas ao forro cuticular do cibário, sendo transmitidas para plantas saudáveis em alimentações subsequentes. No hospedeiro vegetal, *X. fastidiosa* forma um biofilme

compacto, que eventualmente ocasiona oclusão dos vasos do xilema (Purcell & Hopkins, 1996; Hopkins & Purcell, 2002; Alves *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Redak *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2008b).

O gênero *Xylella* é composto por uma única espécie, *Xylella fastidiosa*, e faz parte da família Xanthomonadaceae, a qual inclui também os gêneros *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas*, entre outros menos estudados (Hopkins, 1989; Hopkins & Purcell, 2002; Chatterjee *et al.*, 2008b). A família Xanthomonadaceae pertence à subdivisão gama das proteobactérias, que é modelo em diversificação bacteriana, incluindo espécies comensais e de vida-livre, simbiontes intracelulares e patógenos de plantas e animais (Woese, 1987; Lerat *et al.*, 2005). Diversas espécies dos gêneros *Xylella* e *Xanthomonas* são fitopatogênicas ao contrário de algumas espécies de *Stenotrophomonas*, como *S. maltophilia*, que estabelecem interações benéficas com plantas (Chatterjee *et al.*, 2008a; Kay & Bonas, 2009; Ryan *et al.*, 2009). Por outro lado, *S. maltophilia* é um patógeno humano oportunista, com importância em infecções nosocomiais (Ryan *et al.*, 2009). Análises filogenéticas possibilitaram o agrupamento de isolados de *X. fastidiosa* em seis subespécies: *fastidiosa*, *multiplex*, *sandyi*, *pauca*, *tashke* e *morus* as quais poderiam estar associadas a diferentes hospedeiros (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005; Randall *et al.*, 2009; Nunney *et al.*, 2014; Almeida & Nunney, 2015; Jacques *et al.*, 2016).

*X. fastidiosa* já foi encontrada em mais de 300 espécies de plantas diferentes (EFSA, 2016), em algumas dessas espécies, *X. fastidiosa* existe como uma bactéria aparentemente benigna enquanto que nos hospedeiros suscetíveis, sua proliferação no xilema resulta em sintomas que incluem clorose, lesões necróticas nas folhas, nanismo, deterioração dos galhos, frutos não-aveitáveis, e, eventualmente, morte da planta (Janse & Obradovic, 2010). Entre as doenças associadas à infecção por *X. fastidiosa*, estão a doença de Pierce (PD) das videiras, a clorose variegada dos citros (CVC), popularmente conhecida como amarelinho e a Síndrome do Rápido Declínio das Oliveiras (OQDS) (Cariddi *et al.*, 2014). Além de outras doenças como a a escaldadura foliar de amendoeiras (*almond leaf scorch*, ALS), a escaldadura foliar do cafeeiro ou requeima do café (*coffee leaf scorch*, CLS) e a escaldadura foliar de ameixeiras (*plum leaf scald*, PLS), pessegueiro (PLS-peach), oleandro ou espirradeira (OLS), amoreira, cerejeira, carvalho, sabugueiro e hibisco (Purcell &

Saunders, 1999; Purcell *et al.*, 1999; Hopkins & Purcell, 2002; Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse & Obradovic, 2010).

A doença de Pierce está presente no estado da Califórnia, nos Estados Unidos, desde 1884 e ocorre também em videiras em 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 populacional 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, 1989; Hopkins & Purcell, 2002). Segundo dados do Programa de Controle da Doença de Pierce da Califórnia, esta doença ainda ameaça negócios diretamente derivados da viticultura estimados em mais de 33 bilhões de dólares (<http://www.cdfa.ca.gov/gwss/>). Esta doença apresenta sintomas como a necrose do limbo foliar que se inicia nas bordas e evolui para as regiões centrais e os frutos possuem desenvolvimento severamente afetado, sendo menores e murchos, e, portanto, inadequados para consumo e produção de sucos e vinhos (Hopkins, 1989; Janse & Obradovic, 2010).

A CVC foi identificada pela primeira vez, em 1987, em laranjais do Estado de São Paulo (Rossetti *et al.*, 1990; Chang & Donaldson, 1993), e desde então já foi detectada em pomares citrícolas de outras regiões do Brasil (<http://www.embrapa.gov.br>). Os principais sintomas da doença são lesões cloróticas intervenais na parte superior de folhas maduras e regiões de necrose na parte inferior correspondentes às áreas de clorose da parte superior e, os frutos apresentam tamanho reduzido, endurecidos e sem sumo e com maturação precoce, inviabilizando o consumo *in natura* e sua utilização na indústria de sucos e derivados (Hopkins, 1989; Janse & Obradovic, 2010). Segundo recentes levantamentos pelo Fundo de Defesa da Citricultura (<http://www.fundecitrus.com.br>), a incidência da CVC foi bastante reduzida nos últimos anos, graças aos esforços para produção de mudas saudáveis, aumento do uso de inseticidas para o controle do inseto vetor e a eliminação de pomares velhos, afetados pelo amarelinho.

Os registros de doenças causadas por *X. fastidiosa* ocorriam apenas no continente americano, até meados dos anos 90. Entretanto, relatos de casos deste fitopatógeno têm sido crescentes nos continentes europeu e asiático. A disseminação da Síndrome do Rápido Declínio das Oliveiras (OQDS) no sul da Itália foi detectada em 2013, região que atualmente representa 40% da produção de óleo

de oliva da Itália. Esta região é considerada atualmente um reservatório para *X. fastidiosa*. A contenção da doença está sendo realizada principalmente por meio do controle dos insetos-vetores e, quando possível, pela remoção de plantas doentes (Saponari *et al.*, 2013; Cariddi *et al.*, 2014; Strona *et al.*, 2017).

As plantas infectadas por *X. fastidiosa* apresentam os vasos do xilema bloqueados por agregados celulares bacterianos, os quais são adensados pela presença do exopolissacarídeo (goma) secretado pela bactéria (Alves *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2004a; Roper *et al.*, 2007a; Francis *et al.*, 2008). Este processo é desencadeado pela adesão bacteriana a vasos do xilema e a consequente formação de biofilme, da qual participam adesinas fimbriais e afimbriais, lipopolissacarídeo, o exopolissacarídeo e outros componentes, como DNA extracelular (de Souza *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2005; Roper *et al.*, 2007b; Clifford *et al.*, 2013; Baccari *et al.*, 2014). Assim, os sintomas das plantas infectadas por *X. fastidiosa* parecem estar relacionados aos estresses hídrico e/ou nutricional decorrentes da oclusão do xilema (Purcell & Hopkins, 1996; Hopkins & Purcell, 2002; Chatterjee *et al.*, 2008c). Já foi demonstrado que a infecção por *X. fastidiosa* causa mudanças significativas nos níveis de certos elementos minerais na planta (De La Fuente *et al.*, 2013).

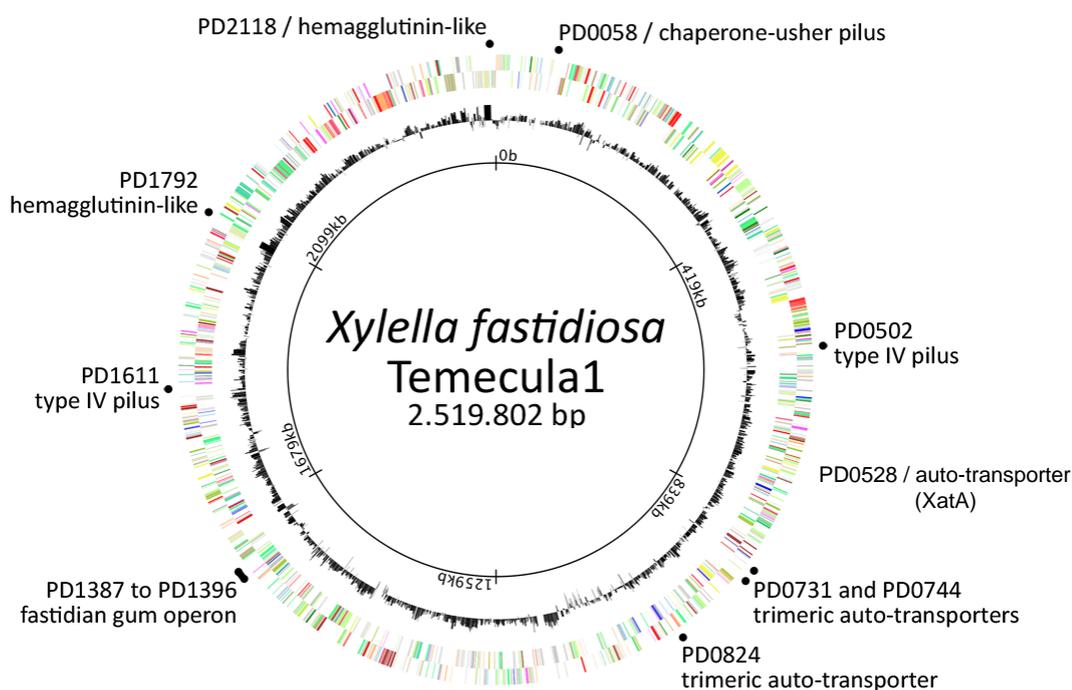
Os sintomas das doenças causadas por *X. fastidiosa* também parecem ter associação com a resposta sistêmica do hospedeiro suscetível à interação com o patógeno (Jones & Dangl, 2006; Gambetta *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Purcino *et al.*, 2007; Silva-Stenico *et al.*, 2009). Além disso, estudos recentes indicam que componentes da superfície celular de *X. fastidiosa* parecem desencadear uma resposta de imunidade inata no hospedeiro vegetal (Han *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013).

No inseto vetor, *X. fastidiosa* também forma um biofilme, estruturalmente distinto do biofilme observado no xilema de plantas infectadas. No inseto as células bacterianas ficam aderidas ao forro cuticular por um de seus polos graças a adesina fimbrial do pilus curto, em monocamada formando um tapete. A fixação polar pode aumentar a ciclagem de nutrientes para o biofilme (Newman *et al.*, 2004a; Almeida *et al.*, 2005; Almeida & Purcell, 2006; Killiny & Almeida, 2008). A formação de biofilme neste local requer o gene *rpfF* (codifica a enzima envolvida na síntese de DSF, fatores de sinalização difusíveis), indicando que genes envolvidos na fixação inicial ou na própria formação do biofilme dependem da sinalização mediada por DSF (Newman *et al.*, 2004a). Também já foi observado que as adesinas não-

fimbriais, como HxfA e HxfB, estão envolvidas na interação carboidrato-célula no forro cuticular do inseto vetor (Killiny & Almeida, 2008). A sobrevivência de *X. fastidiosa* no inseto parece se beneficiar do aproveitamento de quitina (Killiny *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011).

#### 1.4 Fatores de adesão de *X. fastidiosa*

Tanto no hospedeiro vegetal como no inseto, *X. fastidiosa* está exposta a alta turbulência em um ambiente pobre em nutrientes e sujeita a respostas de defesa dos hospedeiros. Nestas condições, a formação do biofilme é estratégica para sua sobrevivência e multiplicação (de Souza *et al.*, 2003; Guilhabert & Kirkpatrick, 2005; Caserta *et al.*, 2010). De modo similar a outras bactérias, também em *X. fastidiosa* a adesão à superfície é um pré-requisito para a formação do biofilme e envolve (Figura 3) a goma fastidiana (EPS), adesinas fimbriais: pilus curto (mrkD) e pilus longo (pilY1) e não-fimbriais: hemaglutininas (HxfA e HxfB), adesinas autotransportadoras (XatA) e adesinas autotransportadoras triméricas (XadA1, Hsf/XadA2 e XadA3, esta última anotada como proteína hipotética no genoma de *X. fastidiosa* e objeto de estudo desta tese) (Fuqua & Danhorn, 2007; Caserta *et al.*, 2010; Flemming & Wingender, 2010b; Voegel *et al.*, 2010; Koebnik *et al.*, 2011; Matsumoto *et al.*, 2012). Diferentes mecanismos de adesão são ativos ao longo da formação do biofilme de *X. fastidiosa in vitro* (Lorite *et al.*, 2013), sendo proposto que a formação do biofilme pode variar dependendo da composição do xilema do hospedeiro (Zaini *et al.*, 2009).



**Figura 3. Fatores de adesão codificados no genoma de *X. fastidiosa*.** Imagem gerada no programa Microbial Genome Viewer 2.0.

#### 1.4.1 Adesinas fimbriais

As adesinas fimbriais são componentes de complexos proteicos chamados pilus (também chamados de fímbrias), que são filamentos projetados a partir da superfície celular (Dunne, 2002). Em *E. coli* e *X. fastidiosa*, por exemplo, pilus tipo I (também chamado pilus curto) é essencial para a adesão celular e formação de biofilme (Blumer *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007a). Os *pili* tipo I são os principais responsáveis pela "ancoragem" das células à superfície em um ambiente de rápido escoamento, facilitando a sobrevivência no rápido fluxo de seiva encontrado nos vasos do xilema dos hospedeiros e no aparelho bucal dos insetos vetores (De La Fuente *et al.*, 2007a; Killiny & Almeida, 2014).

O pilus tipo I (T1P) é um complexo proteico, formado por uma proteína principal (FimA), associada a proteínas auxiliares (FimF, FimG) e a adesina FimH (Mol & Oudega, 1996). Similar em função ao T1P, o pilus tipo III (T3P) também é abundante e curto, sendo caracterizado pelos componentes estruturais MrkA (principal subunidade que é polimerizada) e MrkF (que juntamente com MrkA forma

o pilus propriamente dito), MrkB e MrkC (envolvidas na montagem) e MrkD (adesina na extremidade), além de MrkE, supostamente envolvida na regulação transcricional (Allen *et al.*, 1991; Di Martino *et al.*, 2003). O T3P é o responsável pela formação do biofilme em *Klebsiella pneumoniae* C3091 (Schroll *et al.*, 2010) e diversas outras bactérias Gram-negativas, além de desempenhar importante papel na adesão a diversos substratos como células epiteliais e proteínas da matriz extracelular, entre outros (Tarkkanen *et al.*, 1997; Sebghati & Clegg, 1999; Jagnow & Clegg, 2003).

Possivelmente *X. fastidiosa* seja capaz de montar *pili* curtos de natureza quimérica, pois análise das sequências genômicas já disponíveis revela componentes típicos de ambos tipos, I e III, mas nenhum conjunto completo para montagem de um dos dois tipos. No genoma de todas cepas já analisadas são encontradas CDS para FimA, FimF e FimG, mas não para adesina FimH. Por outro lado, os componentes do T3P estão ausentes, exceto MrkD, justamente a adesina. Ademais, estas CDSs estão proximamente localizadas no genoma, apoiando a idéia de correção e funcionamento em conjunto. Importante ressaltar que as adesinas FimH e MrkD não são similares em sequência de aminoácidos (P.A. Zaini, observações não publicadas). Por esses motivos supomos que o pilus curto formado por *X. fastidiosa* seja um pilus do tipo I, com uma adesina terminal tipicamente encontrada em pilus do tipo 3.

Enquanto a principal função do T1P e T3P é a adesão de células à superfície, o pilus do tipo IV (T4P) desempenha importante função também para a motilidade, sendo responsável pelo movimento celular conhecido como *twitching motility*, caracterizado por ciclos de prolongamento, adesão e retração do pilus, puxando a célula bacteriana em direção à extremidade do pilus (Mattick, 2002; Capitani *et al.*, 2006). Em cada ciclo de deslocamento, os monômeros de PilA que compõem o T4P propriamente dito são polimerizados durante a extensão e desmontados durante a retração. A eficiência do deslocamento é aumentada pela proteína de adesão PilY1, localizada na extremidade do pilus (Li *et al.*, 2007b). Essa adesina além de possuir alta afinidade por receptores na superfície celular dos hospedeiros animais, também é capaz de se ligar a superfícies em geral, como madeira, vidro e PDMS (Li *et al.*, 2007a; Heiniger *et al.*, 2010). Mutantes de *X. fastidiosa* deficientes em T4P funcional tem sua capacidade de adesão prejudicada e o regulador transcricional RpoN é capaz de modular a expressão de componentes do T1P e T4P de forma antagônica, interferindo na formação de biofilme (De La Fuente *et al.*, 2007b; da Silva Neto *et al.*,

2008). Novos aspectos da função de PilY1 têm sido revelados por estudos recentes, incluindo sua capacidade de se ligar a  $\text{Ca}^{2+}$  e regular assim a retração e extensão do T4P (Orans *et al.*, 2010).

#### 1.4.2 Goma fastidiana

A goma fastidiana é considerada um fator de virulência em *X. fastidiosa* por este exopolissacarídeo (EPS) ser o principal constituinte do biofilme, que é essencial para a adesão e sobrevivência da bactéria em ambientes hidrodinamicamente turbulentos como onde são encontradas: vasos do xilema e aparelho bucal do inseto vetor (da Silva *et al.*, 2001; de Pieri *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2011). A goma fastidiana é produzida por enzimas codificadas no operon *gum* que contém nove genes (*gumBCDEFHJKM*). Sua composição difere da goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris*, em que a polimerização de unidades de tetrassacarídeos são montadas pela adição sequencial de glicose-1-fosfato, glicose, manose e ácido glicorônico sobre um carreador de fosfato de poliprenol (da Silva *et al.*, 2001; de Pieri *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2011).

#### 1.4.3 Adesinas afimbriais

Outro grupo de proteínas de adesão encontrado em diversas bactérias patogênicas, inclusive em *X. fastidiosa*, são as hemaglutininas filamentosas. São as proteínas de alta massa molecular codificadas no genoma de *X. fastidiosa* (>300kDa), e assim como em *Bordetella* spp., onde já foram bem caracterizadas, são clivadas gerando proteínas de ~250kDa ao serem transportadas para a membrana externa (Guilhabert & Kirkpatrick, 2005; Julio & Cotter, 2005; Voegel *et al.*, 2010). Essas adesinas são caracterizadas por possuírem um domínio de aglutinação dependente de carboidrato, uma região contendo o motivo formado pelo tripeptídeo RGD característico das proteínas que ligam integrinas, um domínio de ligação a heparina que medeia ligação a glicolipídeos da superfície celular, além de longos peptídeos sinais que são clivados em ambas as extremidades e várias repetições que variam em comprimento e sequência entre os membros dessa família de proteínas (Kajava *et al.*, 2001).

O genoma da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* codifica três cópias de hemaglutininas, sendo duas (XF2196 e XF2775) 97% idênticas entre si e a outra (XF0889) com menor identidade (84%) e deficiente em alguns domínios (RGD e o de clivagem no C-terminal, por exemplo). O genoma da cepa Temecula (isolada de videiras) codifica duas hemaglutininas, HxfA e HxfB, PD2118 e PD1792, respectivamente, as quais são importantes para adesão celular, formação de biofilme e transmissibilidade por insetos vetores por estarem envolvidas a adesão inicial aos vetores (Rojas *et al.*, 2002; Guilhabert & Kirkpatrick, 2005; Killiny & Almeida, 2009a; Voegel *et al.*, 2010; Killiny & Almeida, 2014).

#### **1.4.4 Adesinas autotransportadoras XatA**

Como todas as adesinas autotransportadoras, XatA, possui um domínio de passagem N-terminal e um domínio C-terminal em forma um barril, por onde o domínio de passagem é translocado e ancorado na membrana externa da bactéria. O domínio de passagem geralmente medeia a função específica de virulência. Além disso, evidências recentes indicam que o prefixo 'auto' pode ser um pouco exagerado (Benz & Schmidt, 2011).

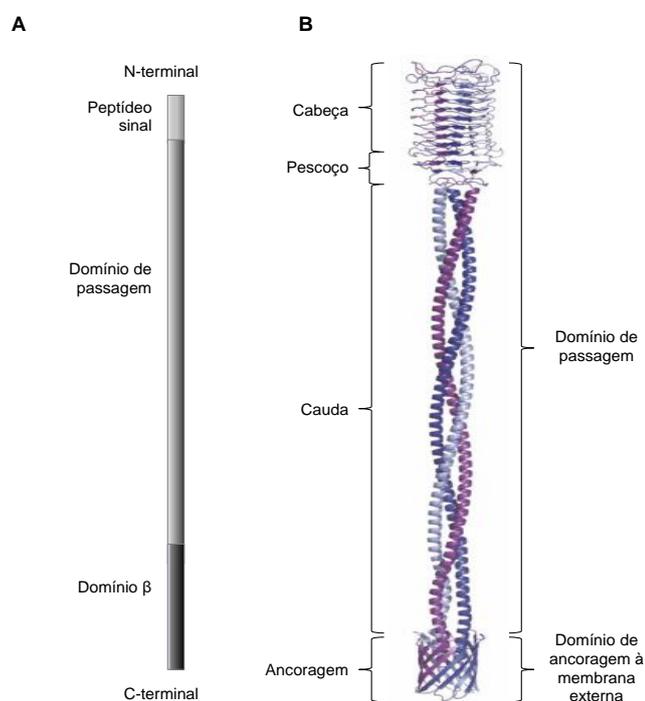
Estudos de localização celular determinaram a presença de XatA tanto na membrana externa celular quanto na membrana externa de vesículas (OMVs) e, sua fração N-terminal no sobrenadante, parte possivelmente clivada. Ensaio laboratoriais indicam sua importância no biofilme e na agregação celular. Sua importância como fator de virulência foi demonstrada por experimentos onde cepas com mutações no gene *xatA* não colonizaram os tecidos de videiras e também não foram transmitidas eficientemente para o inseto vetor (Matsumoto *et al.*, 2012). Entretanto, experimentos são ainda necessários para elucidar a real função de XatA no ciclo de infecção de *X. fastidiosa*.

#### **1.4.5 Adesinas autotransportadoras triméricas**

Outro grupo de adesinas afimbriais codificadas no genoma de *X. fastidiosa* são proteínas similares a Hsf (*Haemophilus influenzae* surface factors) ou a XadA (*Xanthomonas adhesion A*). Uma característica comum em adesinas deste grupo é a presença do domínio YadA na porção carboxiterminal, que define o grupo como

auto-transportadores triméricos (TAA, *Trimeric Autotransporter Adhesin*) (Figura 4). Este é o domínio de ancoragem na membrana externa, sendo razoavelmente conservado entre as diferentes adesinas TAA (da Silva *et al.*, 2001; Linke *et al.*, 2006; Lyskowski *et al.*, 2011). Apesar da denominação autotransportador, alguns estudos tem mostrado que existem proteínas e/ou complexos proteicos envolvidos na biogênese dessas adesinas triméricas (Grin *et al.*, 2013).

Além desse domínio YadA de ancoragem, esta classe de adesinas apresenta o domínio de passagem, composto pelos domínios: cabeça, pescoço e cauda, este último um domínio do tipo *coiled-coil*, além de uma sequência sinal de secreção N-terminal (Nummelin *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2010). O domínio de passagem é externalizado enquanto o domínio de ancoragem (estrutura barril-beta) permanece embebido na membrana externa, sendo que a homotrimerização é importante no processo de localização celular das adesinas TAA, que ocorre, na maioria dos exemplos, sem o envolvimento de proteínas auxiliares (da Silva *et al.*, 2001; Linke *et al.*, 2006; Lyskowski *et al.*, 2011).



**Figura 4. Organização estrutural típica dos domínios do homotrímero das adesinas TAA.** (A) Representação da arquitetura de domínios de um autotransportador típico, possuindo uma sequência sinal, um domínio de passagem, e um domínio beta C-terminal (da Silva *et al.*, 2001) (B) Estrutura 3D

do autotransportador trímérico, mostrando a composição do domínio de passagem e o domínio  $\beta$ , que se ancora na membrana externa para externalizar o domínio de passagem (Linke *et al.*, 2006).

O genoma de *X. fastidiosa* cepa 9a5c codifica três adesinas do tipo TAA, XF1516 (XadA1), XF1529 (Hsf/XadA2) e XF1981, re-annotadas como *Surface protein adhesin XadA-like* (<http://www.xylella.lncc.br/>) e classificadas como autotransportadores triméricos (<http://www.membranetransport.org/>) com base nas características de suas sequências primárias. Passaremos a denominar a CDS XF1981, objeto de estudo neste projeto, como XadA3. Ortólogos de *xadA1*, *xadA2* e *xadA3*, respectivamente PD0731, PD0744 e PD0824, também são encontrados no genoma da cepa Temecula.

Dados da literatura mostram que os níveis dos transcritos de XadA1 e XadA2 são aumentados durante o desenvolvimento do biofilme e que a proteína XadA1 é expressa ao longo de todas as fases da formação do biofilme na cepa 9a5c enquanto que XadA2 é expressa nos estágios mais tardios, não sendo, ambas as proteínas, detectadas em células planctônicas (de Souza *et al.*, 2004; Caserta *et al.*, 2010). A regulação da expressão de XadA1 e XadA2 parece ser mediada pelo regulador transcricional GacA (Shi *et al.*, 2009). Além disso, o mutante em *xadA1*, obtido pela inserção de transposon na cepa Temecula exibe uma redução da capacidade de adesão ao vidro, sendo que ensaios de agregação com células em suspensão mostram que o mutante permanece planctônico por muito mais tempo quando comparado à cepa selvagem, que rapidamente forma agregados celulares que precipitam, sugerindo o envolvimento de XadA1 nas fases iniciais da adesão das células à superfície, além de uma redução na virulência (Feil *et al.*, 2007). Além disso, XadA1 parece ser liberada da superfície bacteriana durante a colonização do xilema (Caserta *et al.*, 2010).

A proteína codificada pela CDS XF1981 (XadA3) na cepa 9a5c, cuja ortóloga na cepa Temecula é PD0824, não havia sido, até este trabalho, bioquímica ou funcionalmente caracterizada, apesar de ter sido detectada em análises proteômicas como fortemente associada a membrana de *X. fastidiosa* e se apresentar como complexo com tamanho molecular >300.000 Da (Smolka *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2009).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente e funcionalmente a adesina XadA3 de *Xylella fastidiosa*.

Para tal, nossas estratégias para alcançar este objetivo foram:

1. Análise comparativa das sequências dos TAAs de *X. fastidiosa*;
2. Obter um anticorpo policlonal Anti-XadA3;
3. Verificar a presença do gene *xadA3* e avaliar os níveis de expressão do transcrito *xadA3* e da proteína XadA3 em diferentes cepas de *X. fastidiosa*;
4. Determinar a localização celular de XadA3;
5. Avaliar comparativamente efeito da deleção de *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* na formação de biofilme, aglutinação celular, motilidade, formação de vesículas de membrana externa, no perfil de expressão gênica global e na virulência de *X. fastidiosa*.

### 3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 Cultivo e manutenção de cepas de *Xylella fastidiosa*

As cepas selvagens e mutantes de *X. fastidiosa* utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Cepas de *X. fastidiosa* utilizadas e seus respectivos hospedeiros de origem.

Cepa	Hospedeiro original	Localidade de origem	Referências
9a5c	<i>Citrus sinensis</i> cv. Natal	Macaubal, SP, Brasil	(Li <i>et al.</i> , 1999)
J1a12	<i>Citrus sinensis</i> cv. Pêra	Jales, SP, Brasil	(Monteiro <i>et al.</i> , 2001)
U24d	<i>Citrus sinensis</i> cv. Baianinha Piracicaba	Ubarana, SP, Brasil	(Santana, 2013)
Fb7	<i>Citrus sinensis</i> cv. Valencia	Bella Vista, Corrientes, Argentina	(da Silva <i>et al.</i> , 2007)
3124	<i>Coffea arabica</i>	Matão, SP, Brasil	(Almeida <i>et al.</i> , 2008)
Hib4	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Campinas, SP, Brasil	(Pierry, 2012)
Pr8x	<i>Prunus salicina</i>	Jarinu, SP, Brasil	(Pierry, 2012)
Temecula1 WT	<i>Vitis vinífera</i>	Temecula, CA, EUA	(Van Sluys <i>et al.</i> , 2003) (Newman <i>et al.</i> , 2003)
Temecula1 $\Delta rpfF$	-	-	(Newman <i>et al.</i> , 2004a)
Temecula1 $\Delta xadA1$	-	-	(Ionescu <i>et al.</i> , 2014b)
Temecula1 $\Delta xadA2$	-	-	este trabalho
Temecula1 $\Delta xadA3$	-	-	este trabalho

O cultivo das cepas foi realizado em meio complexo PW (Davis *et al.*, 1981b) ou em meio PW modificado (PWG). O meio PWG é constituído de fitona peptona 4g/L; peptona de caseína com digestão trípica 1g/L; cloreto de hemina 0,001% (p/v); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4g/L; glutamina 0,4% e glicose 0,5% (p/v). Em alguns experimentos, foi utilizado o meio PIM6 que é composto de HEPES 10 mM pH 6,5; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 3 mM; D-glicose 0,1 mM; tartarato de sódio 0,1 mM; malato de sódio 0,2 mM; citrato de sódio 1 mM; 0,05 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,03 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; L-glutamina 5 mM; 0,025% solução de micronutrientes ATCC13061; 0,02% soytone e 0,04% triptona (Michelle Igo, Universidade da Califórnia, Davis, EUA, comunicação pessoal).

A manutenção das culturas foi feita em placas de meio PWG-ágar (PWG-contendo ágar 1,5%) com repiques semanais e incubação a 28°C, sendo o número de passagens controlado. A cepa Temecula1 WT (*wild type*) foi mantida em placas

de meio PWT (meio PWG sem glicose e com adição de BSA 20%, contendo gelrite 1% (p/v)). As cepas mutantes  $\Delta rpfF$ ,  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  foram mantidas no meio PWT antibiótico contendo canamicina 50  $\mu\text{g/mL}$  (meio PWTK). Após, no máximo, 20 passagens, novo cultivo era iniciado a partir de estoques congelados a -80°C.

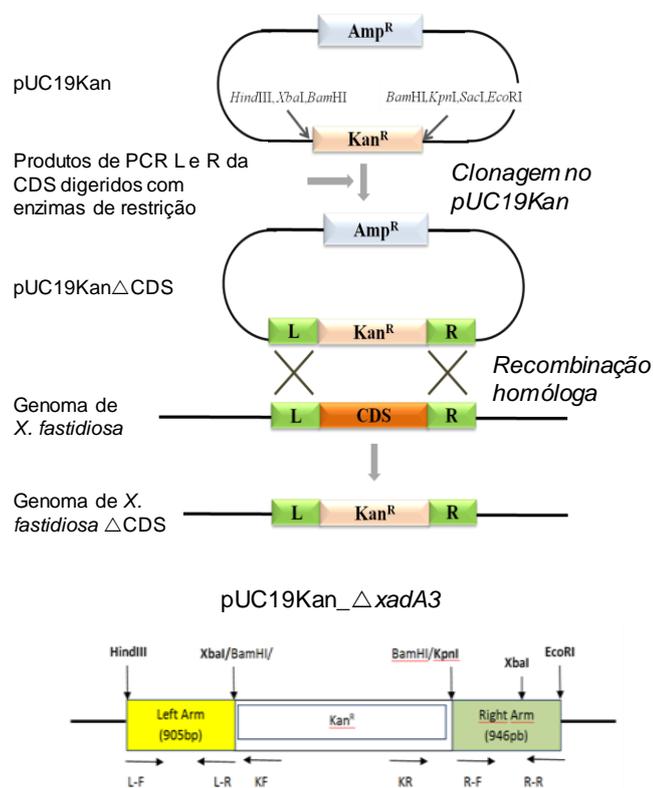
Para o cultivo em meio líquido, as bactérias após 7 dias de cultivo em meio sólido foram cuidadosamente raspadas da placa com uma alça de metal e transferidas para tubos contendo 1 mL de meio PWG. A suspensão de células foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e transferida para frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio PWG, atingindo  $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 0,05$ . Os cultivos foram mantidos a 28°C com 100 rpm de agitação por mais 7 dias. Após esse período, as células foram submetidas aos ensaios desejados.

Os estoques de células foram mantidos em PWG contendo 20% (v/v) de glicerol em freezer a -80°C ou em tanques de nitrogênio líquido.

### 3.2 Deleção de *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* por recombinação homóloga

Para a deleção de *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* da cepa Temecula foi utilizado o protocolo de substituição alélica por recombinação homóloga (Ionescu *et al.*, 2013) como esquematizado na Figura 5. Os segmentos de 900-1000 pb adjacentes ao primeiro e último códon da sequência codificadora de cada uma das CDS (*xadA1*, *xadA2* e *xadA3*) foram obtidos por PCR do DNA genômico da cepa Temecula1 com pares de oligonucleotídeos contendo sítios de enzimas de restrição (HindIII, XbaI, BamHI, KpnI, SacI ou EcoRI) em suas extremidades. Os produtos de PCR obtidos (L e R, *left arm* e *right arm*, respectivamente) flanqueando a CDS foram purificados e clonados sequencialmente no vetor pUC19Kan, adjacentes ao cassete de resistência a canamicina, e as construções obtidas (pUC19Kan $\Delta$ *xadA1*, pUC19Kan $\Delta$ *xadA2* e pUC19Kan $\Delta$ *xadA3*) foram utilizadas para transformação da cepa *E. coli* Topo10. As construções plasmidiais obtidas foram confirmadas por sequenciamento de DNA. Após protocolo de transformação natural (Alencar *et al.*, 2014) da cepa Temecula1 com as construções plasmidiais, os clones transformantes (supostamente com a CDS alvo deletada) foram selecionados pelo cultivo em canamicina. Os clones de mutantes de deleção para *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* foram obtidos por Aline M. da Silva e Michael Ionescu no laboratório do Prof. Steven

Lindow (Universidade da Califórnia em Berkeley, EUA), sendo que apenas o mutante  $\Delta xadA1$  já foi previamente descrito e parcialmente caracterizado (Ionescu et al., 2014b).



**Figura 5.** Estratégia de obtenção dos mutantes de deleção por recombinação homóloga. Produtos de PCR de 900-1000pb obtidos de regiões adjacentes (L e R, *left arm* e *right arm*, respectivamente) à CDS a ser deletada foram clonados no vetor pUCKan nos sítios de restrição indicados, e as construções plasmidiais pUCKan $\Delta$ CDS foram utilizadas para transformação natural da cepa Temecula1. Os transformantes, supostamente com a CDS alvo substituída pelo cassete Kan<sup>R</sup>, foram selecionados em meio contendo canamicina. O esquema inferior representa a construção pUC19Kan\_ $\Delta$ xadA3 para deleção de *xadA3*.

A deleção de *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* nos clones transformantes obtidos foi confirmada por PCR do DNA genômico purificado desses clones (item 3.11 e 3.12). Para tal foram utilizados pares de oligonucleotídeos (Tabela 2) margeando ~130 pares de bases à jusante e à montante das CDS *xadA1*, *xadA2* ou *xadA3*, planejados com auxílio dos programas PRIMER3 e OligoAnalyzer visando a geração de produtos de ~3000 pb, ~8000 pb e ~4200 pb, respectivamente para *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* na cepa Temecula1 selvagem e ~2000 pb para as cepas  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA3$  e ~3000 pb para a cepa  $\Delta xadA2$ . Os clones mutantes também foram

submetidos a genotipagem utilizando os oligonucleotídeos Tem\_1959F e R (Tabela 2) que confirma a identidade da cepa parental Temecula1.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para confirmação da deleção nos mutantes de  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$ .

Identificação	Sequência	Tm*
aPD0731F	5' TACAGATGTGAAAGTGGAAAGTGTGATT	56,6°C
aPD0731R	5' AGACAACCTCGTTCACCTCCCC	60,9°C
aPD0744F	5'GGGTTGCTATGCGCGTTTTTCATTTCG	61,1°C
aPD0744R	5' CTTAGCAATGATCGCGTGGACATCT	59,1°C
aPD0824F	5' CCATATAGGCAACGAAAATCAATTCCAT	56,0°C
aPD0824R	5' CCGTTGCCAATTTGAAACATCTCGAC	58,9°C
Tem_1959F	5' GACTCCGATGGCTACCTGAC	60,0°C
Tem_1959R	5' GAGCGCATTTGTTCCATTG	60,0°C

\* Tm (*melting temperature*)

### 3.3 Curva de crescimento de *X. fastidiosa*

A densidade celular durante o cultivo das cepas foi avaliada pela medida da densidade ótica a 600nm da cultura bacteriana e pela medida da massa proteica total (Pashalidis *et al.*, 2005; Zaini *et al.*, 2008). Para realização da curva de crescimento, as bactérias após 7 dias de cultivo em meio sólido PWG foram raspadas cuidadosamente com uma alça de metal e transferidas para microtubos contendo 1 mL de meio PWG líquido onde as células foram dispersas por repetidas pipetagens. Uma alíquota de 100  $\mu$ L foi então retirada e diluída em 900  $\mu$ L de meio PWG líquido para medida da DO<sub>600nm</sub>. Alíquotas dessa diluição foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL contendo 5 mL de meio PWG, um para cada ponto da curva, sendo a DO<sub>600nm</sub> inicial de  $\approx$  0,05. Os tubos mantidas a 28°C sob 100 rpm de agitação. Foram analisados os dias 1, 3, 7 e 10 da curva de crescimento. Em cada ponto, a cultura foi vigorosamente agitada antes do recolhimento de 2 mL, sendo 1 mL para verificação da densidade celular e 1 mL para medida da massa proteica total. Nesse caso, a alíquota foi centrifugada 16000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Em seguida, as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo e 100  $\mu$ L desse lisado foram utilizados para dosagem de proteína total pelo método Bradford descrito no item 3.10.

### 3.4 Ensaio de Aglutinação

Os ensaios de aglutinação foram baseados nos procedimentos descritos na literatura (Kirkpatrick & Guilhabert, 2005; Espert *et al.*, 2011). Bactérias após 7 dias de cultivo em meio sólido PWG foram raspadas cuidadosamente com uma alça de metal e transferidas para 1 mL de meio PWG, onde foram dispersas para obtenção de uma suspensão homogênea. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  e diluída em 900  $\mu\text{L}$  de meio PWG para determinação da  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ . Os cultivos (1mL) com a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  previamente ajustada para 2 foram transferidos para tubos de 15 mL e mantidos estagnados a temperatura ambiente. A cada ponto do ensaio, a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  da porção superior da cultura foi avaliada representando as células ainda em suspensão.

### 3.5 Ensaio de formação de biofilme

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados como descrito em (Zaini *et al.*, 2009; Fogaca *et al.*, 2010), os quais foram feitos em placa de 96 poços e em tubos de vidro. Para ambos os ensaios as bactérias após 7 dias de cultivo em meio sólido PWG foram raspadas cuidadosamente com uma alça de metal e transferidas para tubos contendo 1 mL de meio PWG. Dessa suspensão homogênea foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  e diluída em 900  $\mu\text{L}$  de meio PWG para verificação da  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ , podendo-se assim ajustar todas os cultivos para a mesma densidade inicial.

Para o ensaio em tubos de vidro, foram transferidos 2 mL do cultivo em meio PWG com  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicial de  $\approx 0,05$ , sendo os tubos mantidos a  $28^\circ\text{C}$  a 170 rpm de agitação. Após 14 dias de cultivo, 1 mL de cada tubo foi retirado para medir a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  e o restante foi descartado. O material não aderido ao tubo de vidro foi lavado adicionando-se cuidadosamente 2 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado 2,5 mL de cristal violeta 0,1%, seguindo-se incubação por 20 minutos, descarte do cristal violeta e lavagem com água por duas vezes. O material aderido à parede do tubo foi removido pela adição de 2 mL de SDS 1% e após vigorosa agitação, a absorbância a 595nm foi determinada.

Para o ensaio em placa de 96 poços, foram transferidos 150  $\mu\text{L}$  de meio PWG do cultivo com  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicial de  $\approx 0,05$ , sendo a placa mantida a  $28^\circ\text{C}$  a 170 rpm de agitação. Após 14 dias de cultivo, a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  foi medida na leitora de placas SpectraMax Paradigm (*Molecular Devices*). O cultivo celular foi descartado e uma

lavagem cuidadosa com água foi realizada, seguindo-se adição de 200 µL de cristal violeta 0,1% em cada poço e incubação por 20 minutos. O cristal violeta foi descartado e os poços foram lavados com água por duas vezes. A cada poço foi adicionado 150 µL de SDS 1%, e após agitação vigorosa da placa, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm no SpectraMax Paradigm (*Molecular Devices*).

### 3.6 Motilidade celular

Os cultivos de *X. fastidiosa* foram realizados em placas nos meios PIM-6, PWG, PWT e PWTK por 7 dias a 28°C. A motilidade celular (*twitching motility*) foi observada na periferia das colônias por meio de lupa com aumento de 40 vezes e, as imagens foram registradas com câmera fotográfica acoplada à lupa.

### 3.7 Ensaios de adesão em condições de fluxo em câmaras de microfluídica

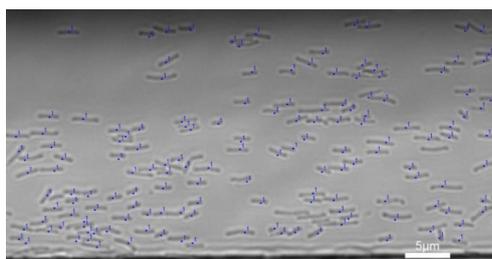
Os ensaios de adesão de células de *X. fastidiosa* à superfície sob condições de fluxo e também para os ensaios de inibição de adesão à superfície com anticorpos foram realizados em câmaras de microfluídica seguindo procedimento previamente descrito por Meng *et al.*, (2005) e De La Fuente *et al.* (2007b).

Câmaras de microfluídica feitas de polidimetilsiloxano (PDMS) (*Dow Corning*) foram construídas a partir de uma placa molde de silício na qual um fotoresistente negativo (SU-8 50, MicroChem) foi aplicado através de métodos fotolitográficos padrões (Xia & Whitesides, 1998), definindo assim o formato e dimensões da câmara. A placa molde foi obtida no centro ANANDA na Universidade McGill, Canadá de acordo com o desenho idealizado pelo Dr. Paulo A. Zaini (IQ-USP).

Para preparação das câmaras, PDMS não polimerizado foi despejado sobre a placa molde e curado por 1 hora a 60°C. O polímero moldado foi então delicadamente destacado e aberturas foram perfuradas nas extremidades dos canais, de acordo com o padrão usado. Em seguida a peça de PDMS moldada foi soldada quimicamente à lamínula de vidro de 35 x 50mm (*Fisher Scientific*), após ambas serem ativadas com ionização por plasma. Esse procedimento foi feito no laboratório do Prof. Dr. Ronaldo Mansano, do Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da USP. Em seguida foi acoplada em cada abertura a tubulação de silicone com 0,02" diâmetro interno e 0,0315" de espessura da parede (*Cole Parmer*) para suprimento de meio fresco e retirada de meio usado. Na outra extremidade de cada mangueira foi encaixado um adaptador de polipropileno de 0,0625" (1,6mm) e a esse foi presa uma seringa de vidro

(Hamilton) de 1 ou 5mL para suprimento ou uma seringa de 20mL (*Becton Dickinson*) sem o êmbolo para coleta. As seringas de suprimento são colocadas em uma bomba de infusão para duas seringas (*Insight*) na qual o fluxo é determinado pelo usuário e mantido constante. Para verificar o selamento da câmara e confirmar que não há vazamentos, inicialmente a câmara foi preenchida com meio de cultura e com fluxo em 200  $\mu\text{L}/\text{minuto}$ . Todo o processo é feito com cuidado para se evitar bolhas de ar no sistema. Em seguida, as células são injetadas pelos canais laterais e o sistema mantido sem fluxo por 5 minutos para permitir a adesão celular à superfície da lamínula da câmara. Em seguida o fluxo desejado é iniciado, geralmente a 1  $\mu\text{L}/\text{minuto}$  e uma rampa geométrica de velocidade até 200  $\mu\text{L}/\text{minuto}$  (correspondente a uma velocidade de fluxo de  $\sim 3$  a  $\sim 700$  mm/segundos) é iniciada com intervalos de 5 minutos em cada velocidade, sendo portanto uma modificação do método descrito em (De la Fuente *et al.*, 2007c).

O monitoramento dos ensaios em câmara de microfluídica foi realizado no microscópio *Nikon TE300* instalado no laboratório do Prof. Frederico Gueiros Filho (IQ-USP) ao qual está acoplada uma câmera fotográfica digital que transfere as imagens captadas ao software *NIS Elements*. Este possui diversas funções capazes de parametrizar diferentes aspectos da atividade celular tais como velocidade de deslocamento e contagem de células. Alternativamente foi utilizado o programa ImageJ 1.48v (<http://imagej.nih.gov/ij>) para a contagem de células como mostrado na Figura 6.



**Figura 6.** Análise de imagens no programa ImageJ. Nesse exemplo, a função de contagem de células está em uso. Essa tarefa é feita em cada imagem coletada ao término de cada intervalo na rampa de velocidade. Os dados são extraídos diretamente para uma planilha, plotados e submetidos a análise estatística no programa Microsoft Excel. Células em contato com as paredes laterais da câmara não são consideradas para evitar efeitos de borda.

### **3.8 Quantificação da produção e isolamento de vesículas de membrana externa (OMVs)**

A produção de OMVs das diferentes cepas de *X. fastidiosa* foi quantificada pela análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*,

NTA) na fração extracelular foi obtida a partir de culturas por três sucessivas centrifugações a 16.000 g (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) seguindo protocolo já padronizado (Ionescu *et al.*, 2014a; Feitosa-Junior, 2017). O volume inicial de 1,4 mL da cultura foi adicionado a um microtubo (1,5 mL) e após centrifugação, metade do volume do sobrenadante foi transferido para novo tubo. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para evitar qualquer contaminação do sobrenadante com o sedimento celular. Após a terceira centrifugação o volume final obtido foi de 350 µL. Foram realizadas 6 preparações para cada cultura totalizando ~2 mL de amostra de sobrenadante que foram reunidas e armazenadas em gelo até análise, realizada no mesmo dia, no equipamento *NanoSight LM10 system* (NanoSight Ltd, Amesbury, Reino Unido), gentilmente disponibilizado pela Dra. Vilma Martins, no Centro do Câncer A. C. Camargo, São Paulo. O aparelho possui um laser de 405 nm e um sistema de câmera digital de alta sensibilidade. Vídeos foram coletados e analisados usando o *NTA-software* (versão 2.3), com o tamanho mínimo de partícula esperado, comprimento mínimo de pista, e definição de desfoque, todos ajustados para o modo automático. A sensibilidade da câmara e o limiar de detecção foram ajustados para 14. A temperatura ambiente foi registrada entre 20 e 22 °C. As amostras foram diluídas em PBS pH 7,4 (137 mM NaCl, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) filtrado em membrana 0,22 µm, de modo que a concentração estivesse entre 1x10<sup>8</sup> e 10x10<sup>8</sup> nanopartículas/mL. Para cada amostra, três vídeos de 30 segundos de duração foram registrados, com ressuspensão e reinjeção da amostra entre as gravações. Réplicas técnicas e biológicas foram realizadas e os dados foram calculados e plotados no programa Microsoft Excel. A densidade celular das preparações foi estimada pela medida de OD<sub>600nm</sub> no momento anterior da coleta do sobrenadante das culturas.

Para isolamento das OMVs cepas de *X. fastidiosa* foram cultivadas por 7 dias em 50 mL de meio PWG a 28°C e 170 rpm, em seguida centrifugadas a 4000 xg, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e 30 mL foram transferidos para um novo tubo, seguindo-se centrifugação a 38000 xg por 1 hora a 4 °C (rotor P28S, Hitachi, Japão). Uma alíquota de 20 mL do sobrenadante obtido foi transferida para um novo tubo, seguindo-se centrifugação a 100000 xg por 5 horas a 4 °C (rotor P28S, Hitachi, Japão). O precipitado foi ressuspendido em 500 µL de 50 mM Tris-HCL/20%glicerol contendo inibidor de proteases Roche© e utilizado imediatamente.

### 3.9 Preparo de extratos proteicos de células de *X. fastidiosa*

Para preparação de extratos proteicos de cepas de *X. fastidiosa*, as células cultivadas em meio sólido PWG, PWT ou PWTK foram raspadas cuidadosamente com uma alça de metal e transferidas para tubos contendo 1 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50mM pH 8.0, glicerol 10% e coquetel de inibidores de proteases cOmplete™ da Roche). A suspensão foi homogeneizada e centrifugada 5200 xg por 4 minutos à 4°C. O sobrenadante, fração extracelular, foi transferido a um novo tubo e armazenado. O precipitado, fração celular, foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de lise e submetido à sonicação com 3 pulsos de 20 s cada, posição 3 (*Branson Sonifier 450*) com intervalos de incubação de 1 minuto em gelo entre cada pulso. Em seguida foi realizada a dosagem de proteínas pelo método Bradford (item 3.10). Os extratos foram armazenados a -80°C por no máximo de 30 dias para posterior análise em SDS-PAGE.

### 3.10 Dosagem de proteínas por Bradford

A determinação do conteúdo proteico nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se BSA (albumina de soro bovino) como padrão. Para montagem da curva padrão foram utilizadas as seguintes concentrações de BSA: 1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL. A reação foi realizada em volume final 1 mL, sendo os volumes das amostras de proteínas completados até 800 µL com H<sub>2</sub>O deionizada e 200 µL de Reagente de Bradford (*BioAgency*) concentrado. Após adição do reagente, as amostras foram vigorosamente agitadas e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos e a absorbância a 595 nm registrada. Após a medição, as concentrações de proteína total nas amostras de interesse foram extrapoladas a partir da curva padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

### 3.11 Extração e purificação de DNA total de *X. fastidiosa*

Para purificação de DNA total de *X. fastidiosa* foi utilizado o *Wizard Genomic DNA Kit* (*Promega*) seguindo as instruções do fabricante com pequenas modificações. Usualmente, a partir de 50 mL de cultura de *X. fastidiosa* de 7 dias é separado 1mL para centrifugação a 13000 xg por 2 minutos. Ao precipitado celular obtido foram adicionados 600 µL da Solução de Lise e as células foram ressuspensas gentilmente com uma pipeta e incubadas a 80°C por 5 minutos. Em

seguida, a suspensão foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos, seguindo-se a adição de 3 µL da solução de RNase, sendo o tubo invertido de 2 a 5 vezes. O lisado celular foi incubado a 37°C por 15 a 60 minutos e em seguida, foi deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução de precipitação de proteína seguindo-se agitação vigorosa em agitador de tubos (Vortex) por 20 segundos na velocidade mais alta. A amostra foi incubada em gelo por 5 minutos e em seguida, o tubo foi centrifugado a 13000-16000 xg por 3 minutos. O sobrenadante contendo o DNA puro foi transferido, em temperatura ambiente, para um microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol com o devido cuidado para evitar contaminação com o precipitado proteico. O tubo foi invertido gentilmente até que os ácidos nucleicos pudessem ter sua massa visível e em seguida, foi novamente centrifugado a 13000-16000 xg por 2 minutos. O sobrenadante foi vertido com cuidado e o tubo foi seco com papel absorvente e a ele foram adicionados 600 µL de etanol 70% (v/v) em temperatura ambiente e o tubo invertido várias vezes para lavagem do DNA precipitado. A amostra foi centrifugada a 13000-16000 xg por 2 minutos e o etanol foi retirado cuidadosamente. O tubo foi seco com papel absorvente e exposto a ar-seco por 10 a 15 minutos, dentro do fluxo laminar. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de reidratação de DNA e o tubo incubado a 65°C por 1 hora. Em seguida, o tubo contendo a amostra de DNA foi armazenado em geladeira ou em freezer a -20°C.

A quantificação da concentração do DNA foi feita através da determinação das absorbâncias (Abs) a 260nm e 280nm em espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop Technologies*), sendo que  $Abs_{260nm} = 1$  equivale a 50µg de DNA fita dupla/mL. A pureza do DNA foi avaliada pela razão das  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$ , geralmente entre 1,8 e 2,0. As amostras de DNA extraídas de *X. fastidiosa* foram analisadas quanto a sua integridade através de eletroforese em géis de agarose conforme descrito no item 3.13.

### **3.12 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para os ensaios de PCR, 2 µL de DNA total purificado dos cultivos bacterianos (100 ng), 2 µL de amostras de cultivos de *X. fastidiosa* ou outras preparações de DNA (10-100 ng) foram misturados com 1 µL de solução de dNTPs 10 mM (*Prodimo*) (0,2 mM final), 10 µL de tampão 5x da GoTaq DNA Polimerase

(*Promega*), 1  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo na concentração de 10  $\mu$ M (0,2  $\mu$ M final), 1  $\mu$ L (1U) da enzima GoTaq DNA Polimerase (*Promega*) e água MilliQ estéril para o volume final da reação de 50  $\mu$ L. As condições de programação dos ciclos do termociclador foram: desnaturação inicial por 2 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 55°C e 90 segundos a 72°C. Em alguns ensaios de PCR as temperaturas de anelamento foram de 56°C ou 58°C, e o tempo de extensão a 72°C foi de 4 minutos e 30 segundos ou de 8 minutos. O controle negativo da reação de PCR foi realizado substituindo-se a quantidade de DNA molde por água Milli-Q. As PCRs foram realizadas em um termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* e os produtos obtidos foram armazenados a 4°C ou congelados a -20°C até avaliação por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Quando necessário, os produtos da PCR foram purificados com o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean up System (Promega)*.

### 3.13 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A separação eletroforética de DNA foi realizada em gel preparado com 1% (p/v) de agarose em pó diluída em tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), sendo a mistura aquecida a 100°C para completa dissolução. Antes da solidificação do gel no aparato apropriado, foram adicionados 2,5  $\mu$ L de solução de brometo de etídio 10 mg/mL para cada 50 mL de solução de agarose. A eletroforese foi realizada em uma cuba eletroforética contendo tampão TBE 1x a 100 V. 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 volume total de amostra aplicado no gel foi de ~10  $\mu$ L (~100 ng de DNA em tampão de amostra (corante azul de bromofenol 0,25% (p/v); sacarose 40% (p/v); Tris-base 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM). Ao final da corrida, o gel foi exposto a luz UV em um fotodocumentador MiniBIS Pro (*DNR Bio Imaging System*) e o tamanho dos fragmentos foi estimado com base na comparação à mobilidade de fragmentos de DNA com tamanhos já conhecidos (*GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas*).

### 3.14 Clonagem de *xadA3* de *X. fastidiosa* em vetor de expressão

O segmento da porção codificadora N-terminal de *xadA3* (CDS XF1981) foi amplificado diretamente do DNA genômico da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* com os pares de oligonucleotídeos F1 e R ou F2 e R listados na tabela 3 visando a geração de produtos com tamanho de ~1000 pb. O *primer* F1 amplifica do 1º ao 451º

aminoácido (1353 pb) que inclui a sequência de uma região putativamente codificadora de peptídeo sinal. O *primer* F2 exclui a porção do peptídeo sinal, amplificando do 92º ao 451º aminoácido (1080 pb).

A PCR para obtenção dos *amplicons* de F1 e F2 foi otimizada e os produtos obtidos foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (item 3.13), seguindo-se purificação com o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean up System* (Promega) e quantificados pela determinação das absorbâncias a 260nm e 280nm em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Os amplicons F1 e F2 foram então ligados ao vetor pGEM-T utilizando-se o *Kit pGEM-T Vector Systems* observando-se relação inserto 3:1 de inserto e vetor. A reação de ligação foi utilizada diretamente na transformação de bactérias competentes XL-1 Blue como descrito no item 3.15, e os clones foram selecionados pelo cultivo em meio contendo ampicilina.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de segmentos de *xadA3*.

Nome do oligonucleotídeo		Oligonucleotídeos	T <sub>m</sub> *
<b>XF1981F1.NcoI</b>	F1	5' GGAGTATTGCCATGGAAATTCATACTGCAC	59.6°C
<b>XF1981F2.NcoI</b>	F2	5' GCTCAAGTCCATGGAAATTCCGACTCG	61.2°C
<b>XF1981R.XhoI</b>	R	5' CTGTATCTCGAGACCCGTTCCAACATTCATG	61.5°C

\* T<sub>m</sub> (*melting temperature*)

As preparações de plasmídeos de colônias selecionadas foram realizadas como descrito no item 3.16. Os insertos clonados no vetor pGEM-T foram excisados com as enzimas *NcoI* e *XhoI* para posterior ligação no vetor de expressão pET28a (*Novagen*).

A reação com as enzimas *NcoI* e *XhoI* continha tampão 4 (*New England Biolabs*), 100 µg/mL de BSA, 1 µg do plasmídeo (construção no pGEM-T), 3 U de cada enzima de restrição. Seguindo-se incubação a 37°C por 3 horas e para a inativação da enzima 65°C por 30 minutos. Os insertos foram separados em gel de agarose 1% (p/v), seguindo-se eluição com o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (*Promega*).

Para ligação ao vetor de expressão pET28a previamente digerido com *NcoI* e *XhoI*, foi utilizado 1 µL da enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs*), 2 µL de tampão, 100 ng de vetor pET28a observando-se a proporção 3:1 de inserto:vetor, seguindo-se incubação por 12-16h a 16°C. As reações de ligação foram utilizadas

na transformação de bactérias competentes BL21(DE3) para o inserto F1 e BL21-Gold(DE3) para o inserto F2. As construções plasmidiais extraídas de colônias selecionadas com antibiótico ampicilina (item 3.16) foram submetidas à reação de sequenciamento de DNA (item 3.17).

### 3.15 Preparo de bactérias competentes e transformação por choque térmico

Repiques, estoques e cultivos das cepas de *E. coli* (XL-1 Blue, BL21 (DE3), BL21-Gold (DE3), ArcticExpress e Rosetta gami) foram realizados seguindo protocolos descritos em manuais de laboratórios (SAMBROOK, 1989) e instruções dos fornecedores dessas cepas (*Agilent Technologies*, *Stratagene*, *Novagen*). A Tabela 4 mostra o genótipo dessas cepas.

**Tabela 4.** Genótipo das cepas de *E. coli* utilizadas para clonagem e expressão recombinante

Cepas de <i>E. coli</i>	Genótipo
ArcticExpress (Agilent Technologies)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm+ Tet <sup>r</sup> gal endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]
BL21 (DE3) (Stratagene)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ(DE3)
BL21-Gold (DE3) (Agilent Technologies)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> dcm+ Hte ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ (DE3) endA Tet <sup>r</sup>
Rosetta gami (Novagen)	Δ( <i>ara-leu</i> )7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA</i> P <i>vull</i> <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>ahpC</i> <i>galE</i> <i>galk</i> <i>rpsL</i> F' [ <i>lac+lacI<sup>q</sup></i> <i>pro</i> ] <i>gor522::Tn10</i> <i>trB</i> pRARE (Cam <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
XL-1 Blue (Stratagene)	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> ΔM15Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]

Estoques das culturas das cepas de *E. coli* foram armazenados a -80 °C em meio LB (Tryptona 1 % (p/v); extrato de levedura 0,5 % (p/v) e NaCl 0,5 % (p/v), pH 7,5) contendo glicerol 20 % (v/v). Quando necessário e dependendo da cepa utilizada, alíquotas destes estoques foram semeadas em placas de meio LBT [meio LB contendo ágar 2 % (p/v) e tetraciclina 15 µg/mL] e incubadas a 37 °C por 16-18 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LBT e crescida a 37°C, por 16-18 horas a 200 rpm. Cerca de 4 mL de pré-inóculo foi transferido para 200 mL de meio LB (extrato de levedura 0.5 % (p/v), triptona 2 % (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM e MgSO<sub>4</sub> 10 mM) líquido fresco, seguindo-se crescimento a 37 °C por 2-3 horas até DO<sub>600nm</sub> = 0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e em seguida coletadas por centrifugação 3300 xg por

20 minutos à 4°C). O sedimento foi ressuspensão em 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril e gelado, mantido em gelo por 60 minutos e centrifugado nas condições anteriores. As células foram suspensas em 0,5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e glicerol 15 % gelados, distribuídos em alíquotas de 100 µL, congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a -80 °C.

Aproximadamente 0,1 µg do DNA plasmidial foi adicionado a 100 µL de bactérias competentes e a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos. Em seguida as células foram incubadas em banho a 42°C por 90 segundos e rapidamente resfriadas em gelo por 5 minutos, seguindo-se adição de 0,9 mL de meio TY 2X (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L pH 7,0), sendo a suspensão bacteriana incubada a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Em seguida, 90 µL desta cultura foram semeados em placas de meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado (ampicilina ou canamicina). Algumas colônias transformantes foram então inoculadas em 5mL de meio LB líquido contendo antibiótico (ampicilina ou canamicina) para preparação de plasmídeos (item 3.16) e análise quanto à presença das construções plasmidiais de interesse.

### **3.16 Preparação de plasmídeos**

As preparações de plasmídeos de colônias selecionadas foram realizadas com reagentes do *kit Pure Link HiPure Plasmid DNA purification (Invitrogen)* de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Antes de iniciar o procedimento foi adicionada uma alíquota de RNase A ao tampão de ressuspensão e a coluna *HiPure Midi* foi equilibrada pela adição de 10 mL de tampão de equilíbrio. Após essas etapas, foi obtido o precipitado de células pela centrifugação (3300 xg por 5 minutos) de 25-100 mL do cultivo do clone bacteriano previamente selecionado. Em seguida, foram adicionados 4 mL do tampão de ressuspensão (contendo RNase) ao precipitado de células. Após completa ressuspensão do precipitado, foram adicionados 4 mL do tampão de lise e o tubo foi gentilmente invertido para mistura da suspensão. O lisado foi incubado em temperatura ambiente por cinco minutos, e em seguida foram adicionados 4 mL de tampão de precipitação, misturando-se a suspensão delicadamente até sua completa homogeneização. Após esse passo, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 15000 xg, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e adicionado à coluna *HiPure Midi* (previamente equilibrada), a qual retém o DNA. Após passagem de toda

a amostra, a coluna foi lavada duas vezes com 10 mL de tampão de lavagem. Após as lavagens, foi realizada a eluição do DNA plasmidial com 5 mL de tampão de eluição. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 3,5 mL de isopropanol ao tubo contendo o eluato, seguindo-se centrifugação por 30 minutos a 15000 xg a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado com cuidado, e o precipitado foi lavado com 3 mL de etanol 70% por centrifugação a 15000 xg a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar, por no mínimo 10 minutos, até completa remoção de resíduo de etanol. Por fim, o precipitado foi ressuscitado em 100-200 µL de tampão TE e armazenado a -20°C. A quantificação da concentração foi feita através da determinação das absorbâncias (Abs) a 260nm e 280nm em espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop Technologies*), sendo que Abs260nm = 1 equivale a 50µg de DNA fita dupla/mL. A pureza do DNA foi avaliada pela razão das Abs260nm/Abs280nm, geralmente na faixa de 1,8 a 2,0.

### 3.17 Sequenciamento automatizado de DNA

A autenticidade das construções obtidas foi confirmada por sequenciamento de DNA no aparelho *ABI PRISM TM 3100 (Applied Biosystems)*, conforme recomendações do fabricante. Em cada reação de sequenciamento foram utilizados 2 µL de *Big Dye terminator mix (Perkin Elmer)*, ~200 ng de DNA, 9,6 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 5), 3 µL de tampão de sequenciamento 5x em um volume final de 15 µL. A reação foi incubada 2 minutos a 96 °C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60 °C. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100%, acetato de sódio 3M pH 5.0 e glicogênio 1 mg/mL, lavadas com etanol 70% (v/v), desnaturadas a 95 °C por 1 minuto e encaminhadas para o serviço de sequenciamento automatizado (SSDNA) no IQ-USP.

**Tabela 5.** Oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento automatizado

Identificação	Sequência
<b>XF1981F1.NcoI</b>	5' GGAGTATTGCCATGGAAATTCATACTGCAC 3'
<b>XF1981F2.NcoI</b>	5' GCTCAAGTCCATGGAAATTCGACTCG 3'
<b>XF1981R.XhoI</b>	5' CTGTATCTCGAGACCCGTTCCAACATTCATG 3'
<b>T7 promoter primer #69348-3</b>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
<b>T7 terminator primer #69337-3</b>	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

### 3.18 Expressão de proteína recombinante

Para avaliar a melhor condição para expressão recombinante de XadA3 foram testadas as cepas *E. coli* BL21(DE)3, BL21-Gold(DE3), Rosetta gami e ArcticExpress. Estas cepas foram transformadas com a construção plasmidial pET28a-XadA3 e cultivadas em 5 mL de meio LB líquido com canamicina (50 µg/mL). Após cultivo por uma noite essas culturas foram diluídas 1:100 vezes em meio fresco e incubadas até  $DO_{600nm} = 0,3$  e a indução da expressão recombinante foi realizada em diferentes concentrações de IPTG ou em diferentes temperaturas ou tempo de indução, dependendo da cepa (Tabela 6).

**Tabela 6.** Diferentes condições testadas para expressão de XadA3 recombinante

Cepa	Tempo de indução	Temperatura	Concentração de IPTG
<b>ArcticExpress</b>	Overnight	10°C	1 mM
<b>Rosetta gami</b>	3 horas	37°C	0,3 mM
<b>BL21(DE)3</b>	3 horas	37°C	0,3 mM
<b>BL21(DE)3</b>	3 horas	37°C	1 mM
<b>BL21-Gold (DE3)</b>	3 horas	37°C	0,1 mM
<b>BL21-Gold (DE3)</b>	3 horas	37°C	1 mM

Após o tempo de indução, as células foram centrifugadas a 10000 xg por 15 minutos, para remoção do meio de cultura. O sedimento bacteriano foi suspenso em tampão de lise PNIβTG (Fosfato 10mM, NaCl 100 mM, Imidazol 20 mM, β-mercaptoetanol 20 mM, Triton 0,1% (v/v), Glicerol 10% (v/v)). A suspensão foi submetida a sonicação com 6 pulsos de 12 s cada, posição 3 (*Branson Sonifier 450*) com intervalos de incubação de 1 minuto em gelo entre cada pulso. As amostras foram centrifugadas a 10000 xg por 15 minutos a 4°C, a fração solúvel foi separada e, o sedimento formado (contendo fração proteica insolúvel e restos celulares) foi ressuspenso em tampão de lise B (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10% (v/v), PMSF 1 mM) para serem lisados novamente por sonicação (3 pulsos de 12 s cada). Após nova centrifugação como anteriormente, o sobrenadante (fração inicialmente insolúvel) foi recolhido e armazenado a -20°C. Esta segunda etapa de lise foi necessária, pois a maior parte da proteína recombinante encontrava-se na fração insolúvel.

A quantificação de proteínas na fração solúvel e insolúvel foi realizada pelo método de Bradford (item 3.10). Alíquotas correspondentes a 10 µg de proteínas da

fração solúvel e insolúvel da cultura induzida ou não com IPTG foram analisadas por SDS-PAGE 15% e coloração com Coomassie Blue (item 3.21).

Após definição das cepas e condições mais adequadas para expressão das proteínas recombinantes (*E. coli* BL21-Gold (DE3) e indução com IPTG 1 mM por 3 horas a 37°C), foi realizado um cultivo em maior escala para posterior purificação das proteínas recombinantes. Uma fração da cultura foi separada como controle sem adição de IPTG (não induzida).

### **3.19 Purificação de XadA3 recombinante por cromatografia de afinidade**

A purificação da proteína recombinante em condições desnaturantes foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de resina Ni<sup>2+</sup>-NTA (*Qiagen*) por meio de eluições com diferentes tampões (C, D e E) contendo uréia. Esta metodologia foi baseada no manual *The QIAexpressionist 2003* (*Qiagen*). Primeiramente, 500 µL de resina foram equilibrados por inversão em um tubo de microcentrífuga e lavados por 3 vezes com alíquotas de 500 µL 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 uma vez com alíquota de 1 mL desse mesmo tampão. Em seguida, a resina foi centrifugada a 16000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente e, após remoção do tampão, incubada com 1 mL da fração insolúvel lisada do extrato bactérias submetidas a indução com IPTG (item 3.18), por 1 hora em homogeneizador (*Heavy dutyrotator, Cole Parmer*) em baixa velocidade. Após a incubação, a resina foi novamente centrifugada por 1 minuto a 16000 xg e o sobrenadante foi recolhido. A fase de eluição foi precedida por lavagens com alíquotas de 300 µL de tampão C (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Uréia 8M, pH 6,3) por 2 vezes, recolhendo-se o sobrenadante por centrifugação a cada lavagem. A eluição foi feita com porções de 300 µL de tampão D (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Uréia 8M, pH 5,9) por 3 vezes, seguido da mesma porção com tampão E (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Uréia 8M, pH 4,5), sempre recolhendo-se o sobrenadante por centrifugação a cada eluição. Alíquotas do material eluído foram dosadas pelo método Bradford (item 3.10), e em seguida analisadas por separação em SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie R (item 3.21).

### **3.20 Preparação de anticorpos anti-XadA3 em coelho**

Uma alíquota da proteína XadA3 recombinante purificada (item 3.19) contendo ~400 µg de proteína total foi submetida a SDS-PAGE e a banda contendo

a proteína recombinante XadA3 foi recortada do gel, transferida a um tubo de ensaio e adicionado 1 mL de água Milli-Q. No dia da imunização do animal, o fragmento de gel contendo a proteína recombinante foi homogeneizado com macerador elétrico, seguindo-se adição de 1 mL de adjuvante de Freund, seguindo-se nova homogeneização. A amostra foi mantida em gelo e entregue às técnicas do Biotério do IQ-USP para imunização do animal, como descrito abaixo. Para a primeira imunização a amostra de ~400 µg de proteína recombinante foi misturada com o adjuvante de adjuvante completo de Freund e na segunda imunização a amostra também de ~400µg de proteína recombinante foi misturada com o adjuvante incompleto de Freund (Certificado nº 11/2012, aprovado pelo CEAU, do IQ-USP, em 22/08/2012).

A manipulação do coelho foi integralmente realizada pelos técnicos do Biotério do IQ-USP seguindo procedimentos e normas de segurança e bem-estar animal. A imunização realizada após duas semanas de adaptação do animal ao biotério. Antes da primeira imunização foi realizada a retirada de 4 mL do sangue do animal através do vaso sanguíneo da orelha (soro pré-imune). As inoculações da amostra da proteína recombinante preparada como descrito acima (1 mL) foi realizada por via subcutânea em quatro pontos do dorso do animal, em intervalo de 15 dias, sendo a primeira com adjuvante de Freund completo e a segunda com incompleto.

Após 15 dias da primeira e da segunda imunização, uma alíquota de 4 mL do sangue foi retirada da orelha para pesquisa de anticorpos anti-XadA3. Uma vez confirmada a presença de anticorpos anti-XadA3, foi realizada a sangria, sendo coletados 40 mL de sangue. Após a sangria, foi realizada a eutanásia, procedimento iniciado através da administração da dose anestésica (50mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg de Xilasina), injetado via subcutânea, esperando o animal entrar em anestesia profunda (verificada através das digitais e globo ocular) e, logo após administrado o dobro da dose anestésica. Após esse procedimento os animais foram submetidos à câmara de gás carbônico somente para verificação.

O soro das amostras de sangue pré-imune do coelho e após 15 dias da imunização foi parcialmente purificado por precipitação com sulfato de amônio seguido de diálise. Par tal, o sangue coletado foi incubado por 1 hora a 37°C e, em seguida, a 4°C por 16 horas. A amostra foi então centrifugada 3000 xg por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante (soro) foi adicionado solução de sulfato de amônio

100% saturada pH 6,8, na proporção de 1:1. Esta suspensão foi mantida por 16 horas a temperatura ambiente. Após esse período, a suspensão foi centrifugada 5000 xg, 15 minutos, 4°C. O sedimento foi ressuspenso em solução 50% saturada de sulfato de amônio, também na proporção 1:1 e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O precipitado final foi ressuspenso em 2 mL e NaCl 0,1 M e dialisado a 4°C contra 1000 volumes de NaCl 0,1 M com uma troca.

### **3.21 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida a 10%, 12,5% ou 15% contendo SDS (SDS-PAGE) em placas (Laemmli, 1970). As amostras a serem analisadas foram ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris 50mM, pH 6,8; DTT 25mM; glicerol 10% (v/v); SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v)], fervidas por 3 minutos antes da aplicação no gel. A eletroforese foi realizada a 200V até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. As proteínas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie R 0,2% (p/v), preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), seguindo-se de descoloração com ácido acético 7% (v/v) em metanol 30% (v/v). Após descoloração, os géis foram mantidos em glicerol 3% (v/v) até captura da imagem em fotodocumentador MiniBIS Pro (*DNR Bio Imaging System*).

### **3.22 Transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e imunodeteção de proteínas (*Immunoblotting*)**

Após SDS-PAGE, o gel foi incubado por 10 minutos em tampão de transferência (Tris base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037 % e metanol 20 %) e os polipeptídeos foram transferidos para a membrana de nitrocelulose (*puraHybond, GE*) pelo método molhado utilizando-se Mini Trans-Blot® Cell (*BioRad*) como aparato de transferência eletroforética (Harlow 1988). Para isto, foi montado o sanduíche para transferência (3 folhas de papel de filtro *Whatman*, membrana de nitrocelulose previamente molhada com tampão de transferência, gel de poliacrilamida e mais 3 folhas de papel de filtro *Whatman*), tendo-se o cuidado de manter todo o conjunto molhado com o tampão de transferência gelado. O cassete montado foi colocado no módulo dentro da cuba e adicionado tampão de transferência até a borda. A corrida foi realizada por 2 horas a 200 V.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi imersa em tampão de bloqueio (~20 mL) e incubada sob leve agitação durante 1 hora em temperatura

ambiente. Logo após, a membrana foi incubada com solução de anticorpo primário na diluição desejada por 16 horas a 4°C. Foram feitas 5 lavagens com 20 mL tampão de lavagem, sob agitação branda por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com 15 mL do anticorpo secundário na diluição de 1:15.000 sob agitação leve por 1 hora em temperatura ambiente (Tabela 7). A solução do anticorpo secundário foi descartada seguindo-se novamente 5 lavagens. Por fim, a captura da imagem da membrana foi realizada no aparelho *Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)* no comprimento de onda de 800 nm e intensidade de 3,5 com uma resolução de 169 µm.

**Tabela 7.** Soluções utilizadas no *Immunoblotting*

Solução	Descrição
<b>TBST</b>	Tris-HCl 0,2 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,1%
<b>Tampão de bloqueio</b>	TBST 5% de leite em pó desnatado
<b>Tampão de lavagem</b>	TBST
<b>Anticorpo primário</b>	TBST BSA 5% (p/v) anti-xadA1:10.000 anti-xadA2 1:400 anti-xadA3 1:2.000
<b>Anticorpo secundário</b>	TBST1x anti-rabbit 800 (Licor) 1:15.000

Os anticorpos anti-XadA1 e anti-XadA2 (Caserta *et al.*, 2010) foram gentilmente cedidos pela Dra. Alessandra Alves de Souza (Centro Apta Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP). O anticorpo anti-XadA3 foi obtido como parte desse trabalho (item 7.1).

### 3.23 Imunomarcção com partícula de ouro (*Immunogold*)

A técnica de imunomarcção com partícula de ouro foi realizada em colaboração com a Dra. Cecília Abe do Instituto Butantan. Para padronização do método de *Immunogold* para *X. fastidiosa* foram testadas 2 técnicas. Na primeira técnica já empregada em trabalhos anteriores (da Silva Neto *et al.*, 2008), as bactérias foram cultivadas por 7 dias em placa PWT, recolhidas da placa e submetidas a lavagem com tampão fosfato salino (PBS 1x) por 3 vezes antes de serem fixadas com 0,3% de glutaraldeído em PBS 1x por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS-BSA 0,2% (p/v) e incubadas nesta solução por 30 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-xadA3 (diluído 1:50 em PBS-BSA 0,2%) por 5 horas. As células foram

lavadas com PBS-BSA 0,2% e incubadas com anticorpo secundário 10 nm *gold-labelled goat anti-rabbit serum* (diluída 1:50 em PBS-BSA 0,2%) por 5 horas. Mais lavagens com PBS e água destilada foram realizadas e as células foram coradas negativamente com ácido fosfotúngstico 2% e adicionadas à tela de 300 *mesh* recoberta com parlódio 1% e incubadas por 5 e 10 minutos. O excesso de líquido retirado e as amostras analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Na segunda metodologia testada (Batchelor *et al.*, 1999), 10 µL de amostra da suspensão bacteriana lavada como descrito acima foi aplicada na tela de 300 *mesh* revestida com parlódio por 5 minutos, o excesso de líquido foi removido e as telas coladas para baixo em gotas de anticorpo primário anti-xadA1 (diluído 1:50 em PBS-BSA 0,2%) por 3 horas. Após lavagem em PBS-BSA 0,2%, as telas foram colocadas sobre gotas de anticorpo-secundário 10 nm *gold-labelled goat anti-rabbit serum* (diluída 1:20 em PBS-BSA 0,2%) por 3 horas. Após mais lavagens com PBS e água destilada, as telas foram secas e examinadas no MET.

As amostras preparadas com ambas metodologias foram examinadas com o microscópio eletrônico de transmissão (MET) *JEOL JEM 2100*, operando a 200 kV.

### **3.24 Extração e quantificação de RNA total**

A extração do RNA total do precipitado celular obtido por centrifugação de cultivos de *X. fastidiosa* (3300 xg, 10 minutos a 4°C) foi realizada com o *Pure Link RNA Mini Kit (Invitrogen)* segundo o protocolo descrito pelo fabricante com algumas modificações. Inicialmente, os precipitados de células foram suspensos com 1 a 3 mL (dependendo da quantidade de células) do reagente Trizol e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos, seguindo-se adição de 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de amostra, com forte inversão do tubo por 15 segundos. Após incubação por mais 3 minutos a temperatura ambiente, as suspensões foram então centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e em seguida 500 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados. Após agitação vigorosa do tubo, ~700 µL das suspensões foram transferidas para filtros-coletores acoplados a tubos coletores, seguindo-se centrifugação a 12000 xg por 15 segundos em temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e os filtros-coletores foram reinseridos nos mesmos tubos coletores. Esta etapa foi repetida até as amostras originais serem processadas por completo. Os filtros-coletores foram lavados com 700 µL de tampão de lavagem I por centrifugação a 12000 xg por 15

segundos em temperatura ambiente e, em seguida inseridos em novos tubos. Os filtros-coletores foram então lavados, por centrifugação a 12000 xg por 15 segundos em temperatura ambiente, com 500 µL de tampão de lavagem II contendo etanol. O filtrado foi descartado, seguindo-se nova lavagem com tampão de lavagem II e centrifugação por mais 1 minuto a 12000 xg para secagem da membrana com o RNA adsorvido. Os filtros-coletores foram inseridos em microtubos e o RNA foi eluído pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC (H<sub>2</sub>O pré-tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% para inativação de RNAses (Ausubel, 1995)). Após a incubação em temperatura ambiente por 1 minuto, os tubos foram submetidos à centrifugação por 2 minutos a 12000 xg em temperatura ambiente e a solução contendo RNA total purificado foi transferida para novo tubo.

A quantificação da concentração de RNA foi feita através da determinação das absorbâncias a 260nm e 280nm em espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop Technologies*), sendo que  $Abs_{260nm} = 1$  corresponde a 40µg de RNA em 1 mL de solução quando a razão  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm} \cong 1,9$ .

As preparações de RNA total destinadas aos experimentos de RNA-seq (3.27) foram submetidas a quantificações mais precisas utilizando o *Quant-iT RiboGreen RNA Assay kit (ThermoFisher Scientific)* segundo o protocolo do fabricante. O kit fornece TE concentrado 20x, RNA de concentração conhecida para a preparação da curva padrão e o reagente fluorescente. As amostras de RNA total purificado devem ser diluídas em TE 1x para concentrações dentro dos limites de detecção da curva padrão (0,78 ng a 50 ng) que é gerada a partir da amostra de RNA de concentração conhecida. Após transferência de 100 µL das amostras de RNA total diluídas e das diluições do RNA de concentração conhecida, em duplicata, para placa de 96 poços (de cor preta para evitar degradação do reagente fluorescente), foram adicionados 100 µL do reagente fluorescente diluído em TE 1x. A leitura da fluorescência foi realizada em um espectrofluorímetro (excitação em 480 nm e a intensidade de emissão medida a 520 nm). Após a medição, os valores de concentração (ng) das amostras de RNA total purificadas foram extrapolados a partir da curva padrão.

A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese capilar no equipamento *BioAnalyzer (Agilent)*, como descrito no item 3.28, a qual permite a avaliação de amostras com concentrações de RNA entre 0,5–50 ng/µL.

### 3.25 Tratamento do RNA total com DNase

O tratamento das preparações de RNA total com DNase foi realizado com o *Illustra RNASpin Mini RNA isolation Kit (GE Healthcare)*, sendo utilizados no máximo 15 µg de amostra de RNA total diluídos em H<sub>2</sub>O-DEPC em volume final de 100µL, ainda que o *kit* tenha capacidade para até 100 µg de RNA total. Foram adicionados à amostra, 350µL do tampão RA1, 3,5 µL de β-mercaptoetanol e 250 µL de etanol 100%, totalizando assim 700 µL que foram aplicados na coluna do kit e centrifugados em temperatura ambiente por 1 minuto a 8000 xg. Após esta etapa, o filtro foi transferido para um novo tubo coletor. Foram adicionados 350 µL da solução *MDB* e o tubo foi centrifugado em temperatura ambiente por 1 minuto a 11000 xg. Após essa etapa, o filtrado foi descartado. À coluna, foram então adicionados 95 µL da mistura de 80 µL do tampão *DNase reaction buffer* e 20 µL da enzima *DNase I*. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 50 minutos. Após incubação, foi realizada uma lavagem com 200 µL do tampão RA2 e centrifugação por 1 minuto a 11000 xg. Seguiram duas lavagens com tampão RA3, uma de 600 µL e centrifugação por 1 minuto a 11.000 xg e outra de 250 µL, com centrifugação por 2 minutos a 11000 xg. O filtrado e o tubo coletor foram descartados e o filtro foi inserido em um tubo de 1,5 mL. A eluição foi realizada com 50 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC pré-aquecida a 50°C e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Ao final, foi realizada uma centrifugação a 11000 xg por 1 minuto. Para melhorar a eficiência, o eluato foi adicionado novamente à coluna e incubado por 1 minuto. A amostra final foi coletada com uma centrifugação por 1 minuto a 11000 xg. Alíquotas de 1,5µL foram separadas para análise da integridade por eletroforese capilar (item 3.28) e confirmação da ausência de DNA na amostra por PCR, antes de sua utilização em experimentos de RT-qPCR ou RNA-seq.

A eficiência do tratamento com DNase foi avaliada por PCR (item 3.12) com o par de oligonucleotídeos CVC-1 (5'AGATGAAAACAATCATGCAAA) e 272-2-int (5' GCCGCTTCGGAGAGCATTCT) (Pooler & Hartung, 1995) que gera amplicons de 500 pb apenas se houver DNA de *X. fastidiosa* contaminante nas amostras nas amostras de RNA.

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

Os ensaios de RT-qPCR para a avaliar a abundância de transcritos de *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* foram realizados com os oligonucleotídeos listados na Tabela 8,

visando a geração *amplicons* de ~150 pb. Os genes *dnaQ*, *rpoD* e *rpsO* foram utilizados como normalizadores nos ensaios de RT-qPCR, pois possui nível de expressão constante nas condições de cultivo (Zaini *et al.*, 2008; Fogaca *et al.*, 2010; Beaulieu *et al.*, 2013). Os pares de oligonucleotídeos listados na Tabela 8 possibilitam a detecção desses transcritos nas diversas cepas de *X. fastidiosa*, conforme confirmado pelo alinhamento de suas regiões genômicas correspondentes.

**Tabela 8.** Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR

Nome do gene	Oligonucleotídeos
<i>xadA1</i>	F 5' CGATAGCGCTGGGTTACAACAG R 5' AACCAGCACCCAAAGCAACCG
<i>xadA2</i>	F 5' TCGATCCGTATGGGCAGTGTGA R 5' AAGCTCGCTTTCAGTGCATCAG
<i>xadA3</i>	F 5' ATTGGTACTACGGCCCGTTCCG R 5' GGTGACACTGCTTGATGCACC
<i>dnaQ</i>	F 5' GGTGCCGAAGTATTATTCACA R 5' CAACCGCGATAACTCGTAATCAA
<i>rpoD</i> *	F 5' GGCTTGAGCGAGGTACAAG R 5' CGTCAACCTCAACAATGAC
<i>rpsO</i> *	F 5' CAGGTTGCACTGTTGACGGC R 5' AAAAGACCACGGCGACTATG

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total pré-tratado com DNase (item 3.25) e 1 µL (~ 500 ng) de *primers* randômicos, perfazendo total de 5 µL. Esta mistura foi incubada a 70°C por 5 minutos, transferida para banho de gelo por 5 minutos. A este volume foi adicionado uma mistura composta de 4 µL de tampão da enzima 5x, 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (3 mM), 1 µL de RNase OUT (20 U), 1 µL da mistura de dNTP a 10 mM cada, 1 µL (200 U) de transcriptase reversa *Improm-II* (*Promega*) e H<sub>2</sub>O-DEPC para um volume final de 15 µL. A reação foi incubada a 25°C por 5 minutos e em seguida, a 42°C por 60 minutos. A inativação da reação foi realizada através de incubação a 70°C durante 15 minutos. O volume da solução de cDNA foi por fim elevado para 100 µL para minimizar variações por erros de pipetagem nos passos seguintes.

Para cada reação de RT-qPCR, foram utilizados 5 µL da amostra de cDNA, 5 µL do par de oligonucleotídeos para cada gene ou CDS, o que corresponde a uma concentração de 800 nM cada, e 10 µL da mistura de amplificação contendo o fluoróforo (*SYBR Green – Applied Biosystems*). Para todas as reações foram incluídos controles negativos do RNA utilizado como molde para a síntese de cDNA e dos oligonucleotídeos utilizados. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador em tempo real (*Applied Biosystems, modelo 7300*), utilizando-se o

seguinte programa: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. O software do equipamento gera curvas de amplificação e dissociação dos oligonucleotídeos para cada amostra analisada e oferece o cálculo automático do CT (*Cycle Threshold*) que corresponde ao número de ciclos de reação realizados até que a amplificação alcance o nível de emissão de fluorescência determinado como limite (em torno de 50% da fluorescência máxima). A relação entre a expressão do gene de interesse e a expressão do gene controle foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , conforme proposto por (Livak & Schmittgen, 2001). Os ensaios foram realizados em triplicata a partir de pelo menos dois experimentos independentes (replicatas biológicas).

### **3.27 Preparação da biblioteca de cDNA para sequenciamento (RNA-Seq)**

Após a análise de integridade (item 3.28) e quantificação por método fluorimétrico (item 3.24) das amostras de RNA, foi iniciado o protocolo de depleção do rRNA utilizando o *Ribo-Zero Magnetic Kit (Gram-negative bacteria) (Epicentre/Illumina)*, utilizando-se ~5 µg de RNA total. Para cada amostra foi preparado um volume de 225 µL de *beads* magnéticas em um microtubo de 1,5 mL. O tubo foi inserido em um suporte magnético e o sobrenadante foi retirado. Seguiram-se duas lavagens com 225 µL com *RNase-free water*, com o tubo ainda no suporte. Após essa etapa, o tubo foi retirado do suporte e as *beads* foram ressuspendidas em 65 µL de *Magnetic bead resuspension solution*, além da adição de 1 µL de *RiboGuard RNase Inhibitor*. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente até o seu uso. Em seguida, foi realizado o tratamento da amostra de RNA total com a *Ribo-Zero rRNA removal solution* para depleção do rRNA e enriquecimento da preparação em mRNAs. Para isso foi montada a reação da seguinte forma: 4 µL de *Ribo-Zero reaction buffer*, 10 µL de *Ribo-Zero rRNA removal solution*, 5 µg de amostra de RNA (máximo de 26 µL) e volume de *RNase-free water* para completar volume final de 40 µL. A reação foi incubada por 10 minutos a 68°C. Após esta etapa, o volume completo do RNA tratado foi adicionado no tubo contendo as *beads* magnéticas previamente preparadas. O tubo foi agitado e deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. Seguiu-se mais um período de 5 minutos de incubação a 50°C. Após essa etapa, o tubo foi inserido no suporte magnético por 1 minuto. Noventa microlitros do sobrenadante foram removidos cuidadosamente e transferidos para microtubo de 1,5 mL. Um pequeno volume

restante foi separado para posterior análise da eficiência da depleção por eletroforese capilar.

A etapa final consiste na purificação da amostra de RNA depletada. Foi realizada uma precipitação por etanol, conforme descrito a seguir. Aos 90  $\mu\text{L}$  da amostra de RNA depletada, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de *RNase-free water*, 18  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 3M, 2  $\mu\text{L}$  de glicogênio (10 mg/mL) e 600  $\mu\text{L}$  de etanol 100% gelado. Após mistura em agitador de tubos, as amostras foram incubadas por 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após este período, foi realizada uma centrifugação a 16000  $\times g$  por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) gelado, com centrifugações de 16000  $\times g$  por 5 minutos. Após a retirada do etanol depois da segunda lavagem, o precipitado foi deixado secando a temperatura ambiente por 5 minutos, com a tampa do tubo aberta.

Após a etapa de depleção do rRNA, foi iniciado imediatamente o protocolo de preparação da biblioteca de cDNA utilizando o *TruSeq RNA sample preparation kit v2 (Illumina)*, com adaptações. Imediatamente após o último passo descrito acima do protocolo *Ribo-Zero*, o precipitado de RNA depletado e seco foi ressuspenso em 18  $\mu\text{L}$  da solução *Elute, Prime, Fragment Mix* do kit *TruSeq RNA* e tubo foi incubado a  $94^{\circ}\text{C}$  por 8 minutos, e em seguida imediatamente transferido para banho de gelo. A partir desta etapa, todos os procedimentos serão realizados em placas de 96 poços. Desta forma, 17  $\mu\text{L}$  da amostra tratada foi transferida para um poço da placa para iniciar o procedimento de síntese da primeira fita do cDNA. Foram adicionados 8  $\mu\text{L}$  da mistura do *First strand Master Mix* com a enzima transcriptase reversa "*ImProm II*" (*Promega*), na proporção de 1  $\mu\text{L}$  da enzima para 9  $\mu\text{L}$  do *master mix*. A placa foi inserida em termociclador com a seguinte programação:  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos,  $42^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos e  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, sendo mantida a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após esta etapa, foi realizada a síntese da segunda fita do cDNA, adicionando-se 25  $\mu\text{L}$  do *Second strand Master Mix* ao poço da placa contendo amostra. A placa foi novamente incubada em termociclador por 1 hora a  $16^{\circ}\text{C}$ .

Após a síntese da segunda fita, foi realizada a purificação do cDNA dupla fita com o uso de *AMPure XP beads*. Para tanto, a amostra foi transferida para uma placa de 96 poços compatível com o suporte magnético e foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  da solução de *beads*. A placa foi deixada incubando por 15 minutos em temperatura ambiente, fora do suporte. Após este período, a placa foi inserida no suporte e incubada por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e foram feitas duas lavagens

com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 80%. Após a retirada do etanol depois da segunda lavagem, a placa foi deixada secando por 15 minutos no suporte magnético. Em seguida, a placa foi retirada do suporte e foram adicionados 52,5  $\mu\text{L}$  de *Resuspension buffer*, seguindo-se incubação por 2 minutos. Após nova incubação por 5 minutos no suporte magnético, foram coletados 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e transferidos para a mesma placa compatível com o termociclador anteriormente usado.

Após a obtenção do cDNA dupla fita, foram realizados procedimentos para a ligação dos adaptadores e índices de cada biblioteca, além de uma etapa de PCR para enriquecimento dos fragmentos gerados. Em uma primeira etapa foi realizado o reparo das extremidades dos fragmentos adicionando 40  $\mu\text{L}$  do *End Repair Mix* ao poço da placa contendo amostra. Opcionalmente, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de uma diluição 1/100 do *End Repair Control*. A placa foi incubada em termociclador por 30 minutos a 30°C. Após, toda a amostra foi transferida para a placa compatível com o suporte magnético e foram adicionados 160  $\mu\text{L}$  das *AMPure XP beads*. Seguiu-se o mesmo procedimento de purificação citado acima, sendo que o a ressuspensão das *beads* foi feita com 17,5  $\mu\text{L}$  de “*Resuspension buffer*” e 15  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram coletados e transferidos para a outra placa. A próxima etapa consistiu em adicionar um nucleotídeo com base adenina na extremidade 3' dos fragmentos, de modo que possa especificamente se ligar aos adaptadores que apresentam um nucleotídeo com base timina na extremidade 3'. Dessa forma, foram adicionados 12,5  $\mu\text{L}$  do *A-Tailing Mix* ao poço contendo amostra. Opcionalmente, foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de uma diluição 1/100 do *A-Tailing Control*. A placa foi inserida em um termociclador com a seguinte programação: 37°C por 30 minutos, 70°C por 5 minutos, sendo mantida a 4°C. Seguiu-se imediatamente para a ligação dos adaptadores. Foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de *Ligation mix*, 2,5  $\mu\text{L}$  do índice adaptador desejado (*barcode*) e, opcionalmente, 2,5  $\mu\text{L}$  de uma diluição 1/100 do *Ligation Control*. A placa foi incubada em um termociclador por 10 minutos a 30°C. Para a parada da reação, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  da solução *Stop ligation buffer*. Após, toda a amostra foi transferida para a placa compatível com o suporte magnético e foram adicionados 42  $\mu\text{L}$  das *AMPure XP beads*. Seguiu-se o mesmo procedimento de purificação citado acima, sendo que a ressuspensão das *beads* foi feita com 52,5  $\mu\text{L}$  de *Resuspension buffer* e 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram coletados e transferidos para outro poço da mesma placa para uma segunda purificação com as *beads*. Desta vez, foram usados 50  $\mu\text{L}$  das *AMPure XP beads* e, ao final, foram usados 22,5  $\mu\text{L}$  de

*Resuspension buffer* para ressuspensão das *beads*; 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram coletados e transferidos para a outra placa. A última etapa consiste no enriquecimento dos fragmentos de cDNA por PCR. Para isso, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  do *PCR primer cocktail* e 25  $\mu\text{L}$  do *PCR Master Mix* ao poço da placa com amostra. A placa foi inserida em termociclador com a seguinte programação: 98°C por 30 segundos e 15 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com mais 5 minutos a 72°C, sendo mantida a 10°C. Para a obtenção da biblioteca final, foi realizada uma última purificação com *AMPure XP beads*. A amostra foi transferida para a placa compatível com o suporte magnético e foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  das *beads*. Ao final, foram usados 32,5  $\mu\text{L}$  de *Resuspension buffer* para a ressuspensão das *beads* e foram coletados 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante (biblioteca final), transferidos para um tubo de 1,5 mL e este armazenado a -20°C. Seguiu-se a análise de distribuição dos fragmentos da biblioteca por eletroforese capilar (item 3.28) e quantificação por qPCR absoluto (item 3.29).

### **3.28 Eletroforese capilar utilizando BioAnalyzer**

As corridas de eletroforese capilar foram realizadas com um equipamento *2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)* para análise da integridade de amostras de RNA, verificação da depleção de rRNA e análise dos perfis de distribuição dos fragmentos em bibliotecas de cDNA para RNA-seq. Em cada caso, foram utilizados diferentes *kits*, respectivamente *RNA 6000 Nano kit*, *RNA 6000 Pico kit* e *High Sensitivity DNA kit*.

Para análises da integridade das amostras de RNA total foram usados os kits *RNA 6000 Nano kit* e *RNA 6000 Pico kit*. O primeiro apresenta intervalo de detecção de 25 e 500 ng/ $\mu\text{L}$  para RNA total e 25 e 250 ng/ $\mu\text{L}$  para mRNA enquanto que o segundo apresenta um intervalo de detecção de 50 e 5000 pg/ $\mu\text{L}$  para análise de RNA total e de 250 e 5000 pg/ $\mu\text{L}$  para análise de mRNA. Para análise de eficiência do procedimento de depleção de rRNA, foi usado o *RNA 6000 Pico kit*. Para ambos os kits, é necessário realizar a preparação e desnaturação do *RNA ladder* que acompanha o kit e que corresponde a fragmentos de RNA de tamanhos conhecidos. A integridade do RNA é avaliada pelo *software* do próprio equipamento, o qual calcula os valores do RIN (*RNA Integrity Number*) (Schroeder *et al.*, 2006) baseado nos tamanhos dos picos observados por todo o perfil eletroforético, incluindo os

correspondentes aos rRNAs 16S e 23S. Definimos que amostras com RIN ~ 8,0 eram adequadas para o prosseguimento das etapas seguintes.

O kit *High Sensitivity DNA kit* foi usado para analisar a distribuição de tamanhos dos fragmentos de cDNA após a construção das bibliotecas para sequenciamento (item 3.27), sendo que apresenta um intervalo de detecção de 5 e 500 pg/ $\mu$ L de DNA.

### **3.29 Quantificação da biblioteca usando qPCR absoluto**

A quantificação precisa das bibliotecas de cDNA foi realizada através de qPCR (PCR quantitativo) absoluto utilizando o *Kapa Library Quantification kit (Kapa Biosystems)* para plataformas de sequenciamento *Illumina*. O kit dispõe de amostras de DNA com concentrações conhecidas para gerar uma curva padrão que varia de 20 pM a 0,0002 pM. Antes do ensaio, as concentrações das amostras são estimadas por medições no espectrofotômetro NanoDrop, tamanho médio dos fragmentos obtido por eletroforese capilar e uma tabela de conversão ng/ $\mu$ L em nM de acordo com o protocolo *Nextera DNA Sample Preparation Guide*, e então diluídas para concentrações dentro dos limites da curva padrão. Os ensaios em triplicata são preparados em placa de 96 poços, sendo que em cada poço são adicionados 12  $\mu$ L do *Kapa SYBR FastqPCR Master Mix*, 4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O-DEPC e 4  $\mu$ L da amostra diluída a ser quantificada ou da amostra com concentração conhecida (curva padrão) ou de H<sub>2</sub>O-DEPC (branco). Os ensaios foram realizados no equipamento *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)* a 95°C por 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 45 segundos. A análise foi realizada com o *software* do próprio equipamento que gera curvas de amplificação para cada amostra e fornece o cálculo do CT (*Cycle Threshold*). Os valores médios de CT foram utilizados para calcular a concentração das bibliotecas com base na curva padrão do *kit*, sendo ainda realizado um ajuste da concentração baseado no tamanho médio dos fragmentos de cada biblioteca.

### **3.30 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA no equipamento MiSeq**

O sequenciamento das bibliotecas de cDNA foi realizado no equipamento *MiSeq (Illumina)* instalado no Centro Avançado de Tecnologias em Genômica (CATG) do IQ-USP. Algumas poucas corridas foram realizadas no *MiSeq* instalado no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) do ICB-USP. As corridas foram realizadas com *MiSeq Reagent Kit v2* de 500 ciclos com a estratégia de

sequenciamento *Paired-End* que resulta em sequências (*reads*) de até 250 nucleotídeos para cada extremidade de um fragmento sequenciado. No máximo 8 bibliotecas de cDNA com índices distintos e compatíveis foram sequenciadas em uma mesma corrida. Antes de iniciar o sequenciamento, a concentração das bibliotecas a serem sequenciadas foi ajustada para 4 nM e o mesmo volume de cada uma delas foi misturado em um único tubo, seguindo-se adição de volume igual de NaOH 0,2N e incubações a temperatura ambiente por 5 minutos e a 95°C por 1 minuto. Após essa etapa de desnaturação, foi realizada a diluição com tampão fornecido pelo *kit* para concentração final de 6 a 10 pM, seguindo-se aplicação de todo volume (600  $\mu$ L) do *pool* desnaturado de bibliotecas no cartucho de sequenciamento.

O *workflow* escolhido para a análise após a corrida foi o *Generate FastQ*. Tal formato de arquivo de saída permite obter as sequências geradas na corrida (*read1* e *read2*), acoplado com a informação da qualidade para cada nucleotídeo sequenciado.

### 3.31 Análises de dados de RNA-seq

Após o término do sequenciamento, são gerados arquivos em formato *FastQ* contendo as sequências (*read1* e *read2*) com informação do escore de qualidade (*Q score*) para cada nucleotídeo, atribuído pelo *software* do próprio *MiSeq*. Os arquivos *FastQ* gerados para cada biblioteca foram submetidos a análise com o *software* *FASTQC* (Andrews *et al.*, 2014), que gera plotagens baseadas no *Q score* por base sequenciada, distribuição de *Q score* médio de cada sequência obtida, conteúdo de adaptadores remanescentes, entre outras informações.

O mapeamento das sequências obtidas pelo sequenciamento das bibliotecas de cDNA foi realizado utilizando o *software* *CLC Genomics Workbench*, versão 6.5 (<http://www.clcbio.com>) com o módulo *RNA-Seq analysis*. Foram utilizados arquivos em formato *.gbk*, o qual contém as sequências anotadas dos genomas das cepas de *X. fastidiosa*. Duas opções de mapeamento foram realizadas, gerando listas de genes com valores de expressão normalizados por FPKM (*Fragments per kilobase transcript per million reads*) (Mortazavi *et al.*, 2008) ou com valores brutos de contagem de *reads* para cada gene. Previamente ao mapeamento foi realizado procedimento de *quality trimming* usando este mesmo *software*, no módulo *Trim sequences*, com escore de corte Q30.

Análises de correlação de Pearson foram realizadas usando os valores de expressão por FPKM na função *cor.test* do pacote *stats* do *software R* (R Core Team, 2013). Para as análises estatísticas de expressão diferencial entre genes de transcritomas diferentes, foi usado o pacote *DESeq2* (Love *et al.*, 2014) do *software R* (R Core Team, 2013), usando como entrada valores brutos de contagem de sequências para cada gene. Como parâmetros para definir um gene como diferencialmente expresso entre duas condições distintas foi estabelecido ter um valor de *p*adj < 0,05 e um valor de  $\log_2$ FoldChange > 1. A função *plotMA* do mesmo pacote foi usada para gerar os gráficos de dispersão dos genes baseado em seus respectivos valores de expressão média e razão de expressão. A função *pie* do pacote *graphics* do *software R* (R Core Team, 2013) foi usada para gerar os gráficos de distribuição das categorias COG.

### 3.32 Análises bioinformáticas

Para pesquisa de identidade/similaridade de sequências de DNA ou de proteínas foram utilizados os programas BLASTn, BLASTp e BLASTx (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) em bases públicas de dados tais como *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *X. fastidiosa* Genome Project (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>) e *X. fastidiosa* Comparative Genome Project (<http://www.xylella.lncc.br/>). Para recuperar as sequências de CDS das diferentes cepas de *X. fastidiosa* e compará-las, utilizamos a plataforma IMG-ER (*Integrated Microbial Genomes-Expert Review*) (Markowitz *et al.*, 2012), disponível em <http://img.jgi.doe.gov/>.

Para o alinhamento de sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos foi utilizado o programa ClustalX ou ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1997). O planejamento de alguns oligonucleotídeos foi realizado com o programa PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000) e para analisar as propriedades dos oligonucleotídeos gerados pelo PRIMER3 utilizamos o programa OligoAnalyzer (Owczarzy *et al.*, 2008).

O programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) foi utilizado para analisar os resultados de sequenciamento automatizado.

As ferramentas do *Expasy* (*Translate e Compute pI/Mw*) (Gasteiger *et al.*, 2003) e o *software Recombinant Protein Solubility Prediction* (Universidade de

Oklahoma, <http://biotech.ou.edu/>) foram utilizados para avaliar as características preditas para as proteínas recombinantes planejadas.

Para predição de domínios foi utilizado o *Pfam* (Finn *et al.*, 2008) e para predição da localização subcelular das proteínas de interesse foi utilizado PSORTb 3.0.2 (Yu *et al.*, 2010). As proteínas também foram submetidas à análise com o Servidor SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) para predição da posição de clivagem do peptídeo sinal ([cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/)). De maneira similar, foi realizada a predição de secreção não-clássica utilizando-se o servidor SecretomeP 2.0 (Bendtsen *et al.*, 2005) ([cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/](http://cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/)). Modelos de estrutura tridimensional de proteínas foram obtidos com o programa Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015).

### **3.33 Colonização de plantas com *X. fastidiosa* e transmissão pelo inseto-vetor**

Os ensaios de inoculação de videiras com diferentes cepas de *X. fastidiosa* e de transmissão pelo inseto-vetor foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Steven Lindow, Universidade da Califórnia, Berkeley (EUA) seguindo protocolos bem estabelecidos (Hill & Purcell, 1995; Newman *et al.*, 2004b; Ionescu *et al.*, 2013; Baccari *et al.*, 2014).

As plantas (*Vitis vinifera* variedade Cabernet Sauvignon) foram crescidas em casa de vegetação até 50 cm de altura e mecanicamente inoculadas com as cepas selvagem e mutantes de *X. fastidiosa*, utilizando-se delicadas perfurações na base de um pecíolo após adição de uma gota (5  $\mu$ L) da suspensão de células ( $10^8$  células/mL). Após 10-12 semanas da inoculação o sintoma da doença de Pierce é avaliado pela contagem de folhas sintomáticas.

Para os ensaios de transmissão pelos insetos (Newman *et al.*, 2004; Baccari *et al.*, 2014) aproximadamente 30 a 40 insetos (*Graphocephala atropunctata*) são alimentados em dispositivo de dieta artificial com a cepa de interesse por três dias. Os insetos foram então colocados em telado juntamente com plântulas saudáveis por um período de 7 dias, para que estes pudessem se alimentar do xilema e assim transmitir *X. fastidiosa*. Após esse período essas plantas são mantidas em casa de vegetação por até 8 semanas, quando procede-se a verificação da presença de *X. fastidiosa* pela maceração do tecido, plaqueamento e contagem de colônias e por PCR. A porcentagem de plantas que testam positivo para *X. fastidiosa* é definida como taxa de transmissão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Adesinas da família dos auto-transportadores triméricos em *X. fastidiosa*

*X. fastidiosa* possui adesinas fimbriais e não-fimbriais que estão envolvidas na formação de biofilme, as quais são potencialmente os fatores responsáveis pela colonização eficiente de insetos vetores e plantas hospedeiras. Entre a classe de adesinas não-fimbriais, o genoma de *X. fastidiosa* codifica três adesinas da família dos auto-transportadores triméricos (TAAs) aqui denominadas XadA1, XadA2 e XadA3. O envolvimento de XadA1 e XadA2 (também denominada Hsf) na formação do biofilme bem como alguns aspectos da regulação da expressão destas proteínas já foram investigados em trabalhos anteriores (de Souza *et al.*, 2004; Feil *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2009; Caserta *et al.*, 2010). Porém, a função e as características bioquímicas de XadA3, até o início desse trabalho, eram desconhecidas, apesar desta proteína ter sido detectada em análises proteômicas como fortemente associada a membrana de *X. fastidiosa* (Smolka *et al.*, 2003).

Na Tabela 9 e na Figura 7 estão mostradas algumas características preditas para estas proteínas a partir da análise de suas sequências codificadas nos genomas das cepas Temecula1 e 9a5c, agentes causais, respectivamente, da doença de Pierce de videiras e da Clorose Variegada dos Citros.

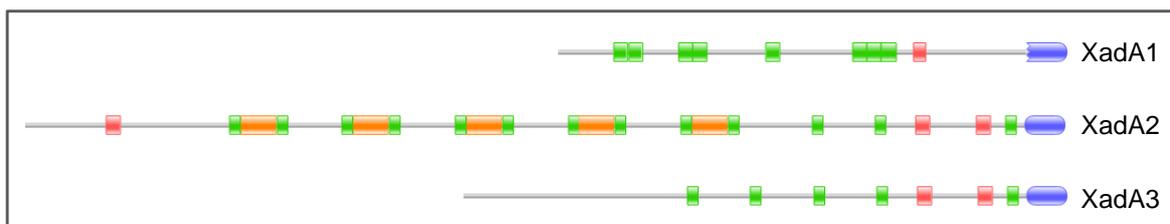
**Tabela 9.** Características das três adesinas da família de auto-transportadores de *X. fastidiosa* nas cepas Temecula (Tem) e 9a5c.

Cepa	Número da CDS <sup>a</sup>		Número de aminoácidos <sup>b</sup>		Massa molecular predita (kDa) <sup>b</sup>		Identidade <sup>b</sup> Tem x 9a5c
	Tem	9a5c	Tem	9a5c	Tem	9a5c	
<b>Adesina</b>							
XadA1	PD0731	XF1516	997	1004	97,5	98,2	94%
XadA2	PD0744	XF1529	2504	2059	248	204	91%
XadA3	PD0824	XF1981	1315	1190	130,5	118,5	93%

<sup>a</sup>Número da CDS segundo anotação original dos genomas dessas cepas.

<sup>b</sup>As informações sobre as três CDS foram recuperadas do IMG-M <https://img.jgi.doe.gov/> de acordo com recente reanotação dos genomas dessas cepas.

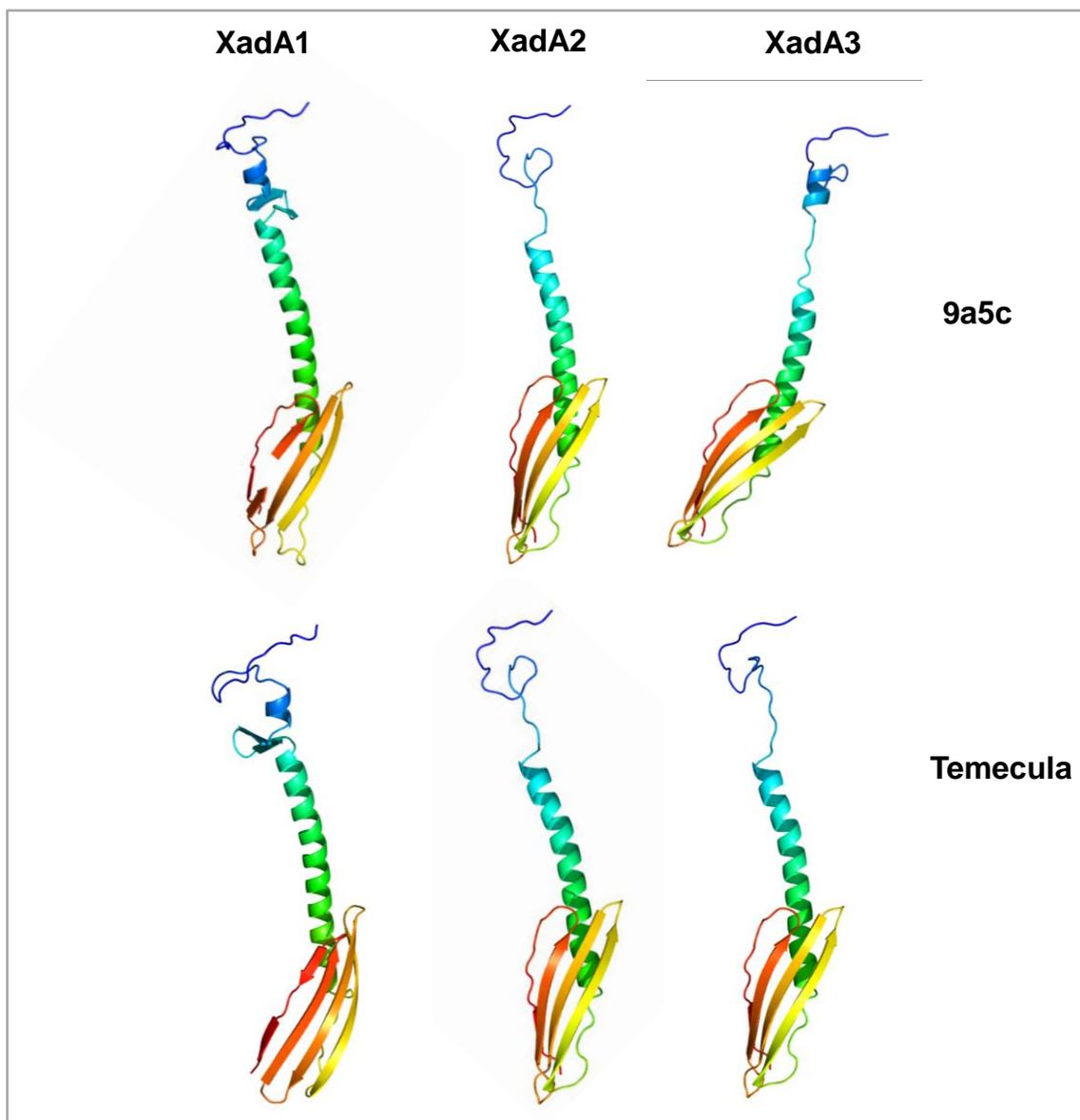
<sup>b</sup>A identidade média entre a sequência de aminoácidos predita para os ortólogos das cepas Temecula e 9a5c foi determinada utilizando-se BLASTp.



**Figura 7. Organização estrutural dos domínios preditos nas adesinas XadA1, XadA2 e XadA3 na cepa 9a5c.** A predição foi realizada com a ferramenta PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). O domínio carboxi-terminal *YadA anchor*, característico de auto-transportadores triméricos, está indicado em azul. As caixas em verde representam o domínio *Yad stalk* (repetições Hep-Hag: repetições de 7 aminoácidos típicas de hemaglutininas), em vermelho representam domínio *Yad head* (domínios de hemaglutininas) e em laranja, domínios encontrados em outras proteínas de superfície de *X. fastidiosa*.

Como esquematizado na Figura 7, as três adesinas de *X. fastidiosa* apresentam o domínio carboxi-terminal *YadA anchor*, característico de auto-transportadores triméricos (Leo *et al.*, 2012). A análise da sequência das três XadAs com o software SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) não aponta para existência de uma sequência sinal amino-terminal típica, como se espera de proteínas sejam direcionadas e transportadas através da membrana interna (Desvaux *et al.*, 2006). A sequência sinal amino-terminal é considerada uma região de tamanho variável, podendo ter de 20 até 50 aminoácidos (Henderson *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 2005; Desvaux *et al.*, 2006). Por outro lado, a análise com o software SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2005) resultou em *SecP score* >0,94 para todas três XadAs, uma predição confiável de que essas proteínas são secretadas por vias não-clássicas.

A predição da estrutura tridimensional das três XadAs (Figura 8) sugere a existência de diferenças em seus respectivos domínios de passagem tanto na cepa Temecula quanto na 9a5c. Observa-se também que todas mantêm a estrutura de folhas beta no domínio C-terminal e são praticamente idênticas, com exceção da XadA1 que, de fato, apresenta um domínio *YadA* incompleto (Figura 8). Uma hipótese a ser futuramente investigada é se a quebra na folha beta no domínio C-terminal da adesina XadA1 favoreceria a presença dessa proteína no meio extracelular e/ou em vesículas de membrana externa (OMVs) (Ionescu *et al.*, 2014a). Já foi mostrado que os resíduos de aminoácidos da região C-terminal de TAA são determinantes para o reconhecimento e montagem do trímero pelo complexo Bam (2010).



**Figura 8. Estrutura 3D predita das XadAs das cepas 9a5c e Temecula.** A predição da estrutura de cada monômero foi realizada com o programa Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015).

As três XadAs são codificadas em todos genomas de *X. fastidiosa* sequenciados até o momento (mais de 20 genomas), sendo que as identidades de suas respectivas sequências entre as várias cepas é >90% (dados não mostrados). Uma hipótese a ser considerada é se as pequenas diferenças de sequências de aminoácidos entre XadAs estariam relacionadas à especificidade das distintas cepas por um determinado hospedeiro vegetal.

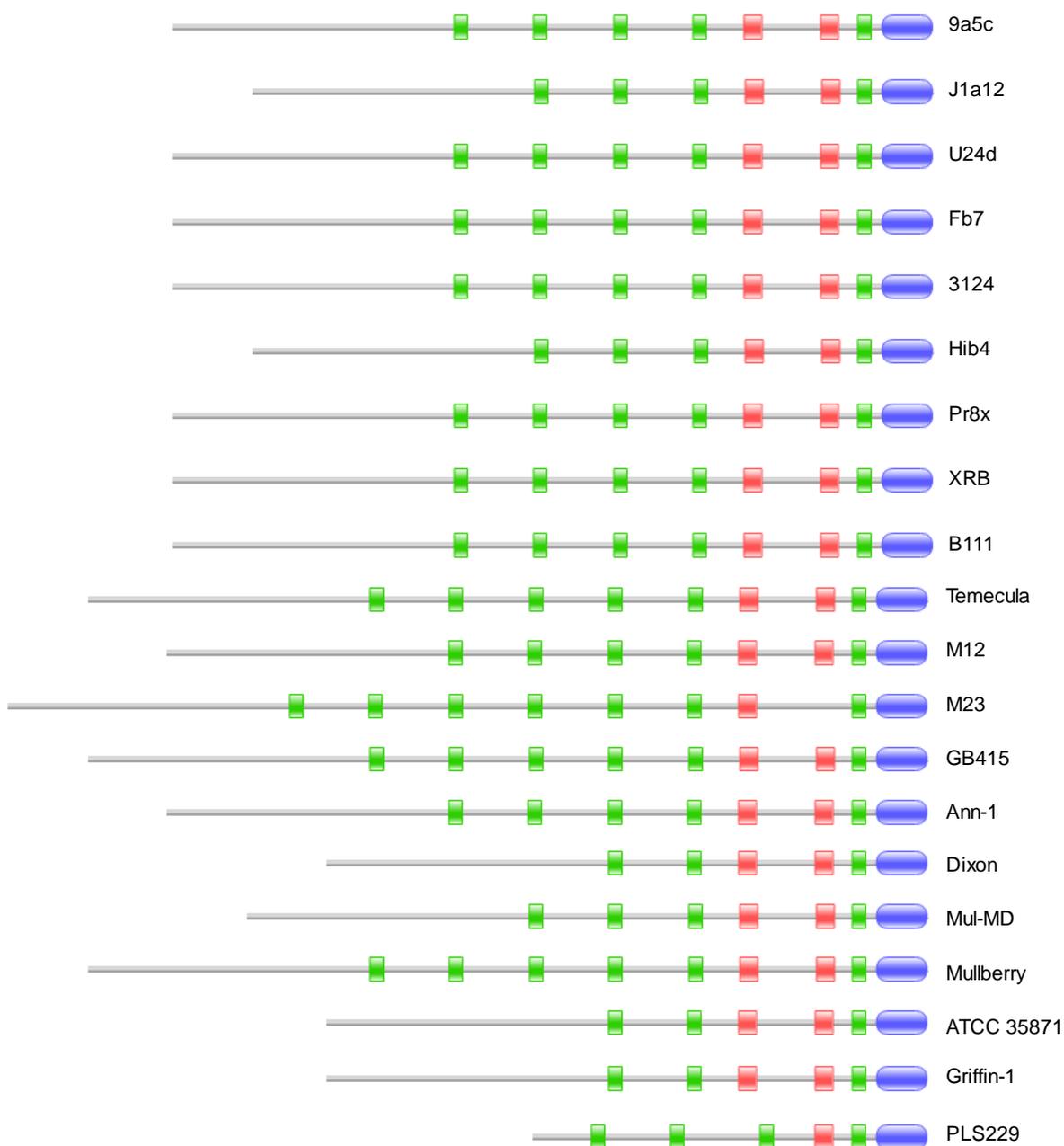
## 4.2 A adesina XadA3 em diferentes cepas de *X. fastidiosa*

A Tabela 10 lista o tamanho da sequência de aminoácidos de XadA3 de algumas das cepas de *X. fastidiosa* isoladas de diferentes hospedeiros vegetais cujo genoma já foi sequenciado. Cabe destacar as diferenças de tamanhos entre as cepas e a ocorrência de polimorfismos que são evidentes da comparação dessas sequências (item 7.1, apêndice).

A organização estrutural dos domínios preditos nas XadA3 das diferentes cepas está ilustrada na Figura 9. Pode se observar que apesar da XadA3 nas diferentes cepas apresentar-se em diferentes tamanhos, sempre mantêm os domínios da região carboxi-terminal conservados. Isso condiz com estudos já realizados para auto-transportadores que mostram que o domínio de ancoragem (domínio YadA) é razoavelmente conservado entre as diferentes adesinas TAA, diferentemente do domínios cabeça, pescoço e cauda que contém variados motivos tais como *YadA-Like Head Domain/ Hep-Hag (left handed parallel  $\beta$ -roll repeats)*, *Hia*, entre outros menos conservados (Szczeny *et al.*, 2008). As XadA3 de todas as cepas analisadas possuem pelo menos 3 repetições *Hep-Hag* (repetições de 7 aminoácidos típicas de hemaglutininas, onde até 10 cópias podem estar presentes) e, quase todas possuem os 2 domínios típicos de hemaglutininas (em vermelho), menos as cepa M23 e a PLS229 que só possui 1 domínio típico de hemaglutininas.

**Tabela 10:** Tamanho da sequência de aminoácidos de XadA3 em cepas de *X. fastidiosa* isoladas de diferentes hospedeiros.

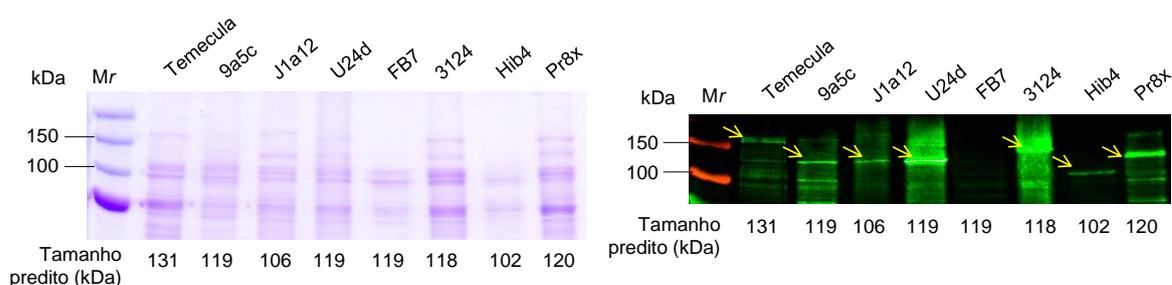
<b>Cepa</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>aa</b>
<b>9a5c</b>	<b>Laranjeira doce</b>	<b>1190</b>
J1a12 (não-virulenta)	Laranjeira doce	1065
U24d	Laranjeira doce	1190
Fb7	Laranjeira doce	1190
3124	Cafeeiro	1190
Hib4	Hibisco	1065
Prx8	Ameixeira	1190
XRB	Laranjeira doce	1190
B111	Laranjeira doce	1190
<b>Temecula</b>	<b>Videira</b>	<b>1315</b>
M12	Amendoeira	1190
M23	Amendoeira	1440
GB514	Videira	1315
Ann-1	Espirradeira	1190
Dixon	Amendoeira	940
Mul-MD	Amoreira	1065
Mullberry	Amoreira	1315
ATCC 35871	Ameixeira	1440
Griffin-1	Carvalho Vermelho	940
PLS229	Pera	616



**Figura 9. Organização estrutural dos domínios preditos nas adesinas XadA3 de diferentes cepas de *X. fastidiosa*.** A predição foi realizada com a ferramenta PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). O domínio carboxi-terminal YadA, característicos de autotransportadores triméricos está indicado em azul. As caixas em verde representam repetições Hep-Hag (repetições de 7 aminoácidos típicas de hemaglutininas), em vermelho representam domínios de hemaglutininas. O tamanho predito para a proteína de cada cepa bem como o hospedeiro vegetal do qual foi isolada estão indicados na Tabela 10.

Ressaltamos, que vários dos genomas de *X. fastidiosa* estão incompletos e podem conter erros de sequenciamento e/ou de montagem. Dessa forma, os polimorfismos identificados tem que ser tomados com cautela, até que sejam confirmados pelo re-sequenciamento dessas regiões. Este foi o caso da sequência de *xadA3* nos genomas das cepas 3124, Hib4 e Prx8, que apresentava polimorfismos (deleções e inserções) que resultavam em fragmentação da sequência codificadora predita. Nesse caso, as cepas 3124, Hib4 e Prx8 aparentemente não expressariam XadA3 íntegra e funcional. Consideramos a possibilidade da ocorrência de erros no sequenciamento do genoma, e, portanto, a região de interesse foi amplificada por PCR e foi resequenciada pelo método de Sanger. Os resultados do re-sequenciamento estão apresentados no item 7.1.

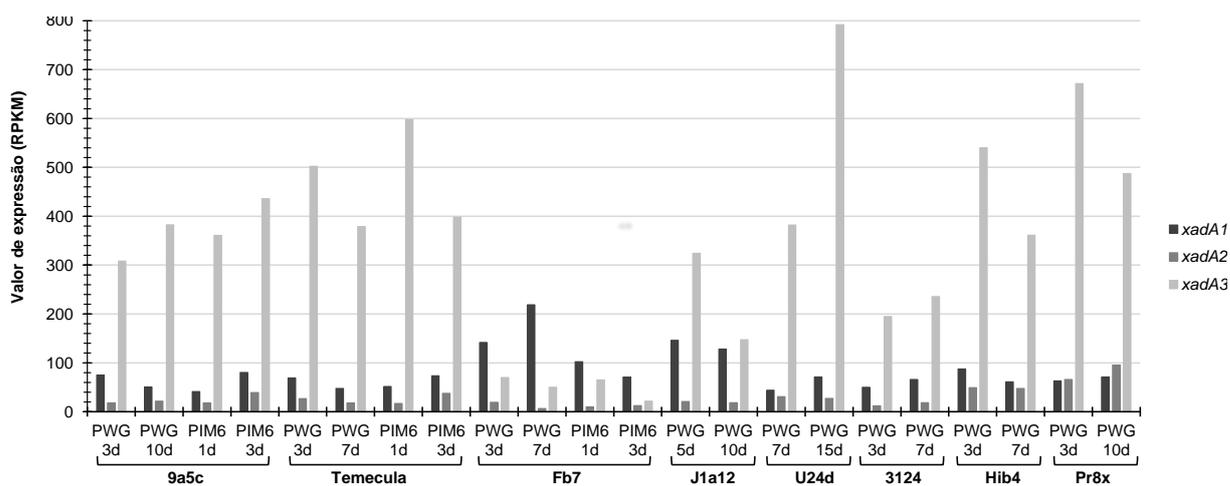
A verificação do tamanho da XadA3 foi realizada pela análise da proteína por *immunoblotting* extratos totais de células *X. fastidiosa* de cepas que dispomos em nosso laboratório. A Figura 10 mostra que anticorpo anti-XadA3 (item 7.1) detectou polipeptídeos com tamanhos semelhantes aos preditos por análises *in silico* para as 8 cepas de *X. fastidiosa* testadas com exceção da Fb7. Destacamos a diferença no tamanho de XadA3 da cepa Temecula que é bem maior que a XadA3 da cepa 9a5c (Figura 42, Apêndice Figura 10), como predito (Tabela 10).



**Figura 10. Análise de XadA3 em extratos total de 8 cepas de *X. fastidiosa*.** Alíquotas de 10 µg de extrato total das 8 cepas foram analisadas por SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue (imagem à esquerda) ou transferidos para membrana de nitrocelulose. A imagem à direita mostra a detecção com anticorpo anti-XadA3 1:2000, revelado com anticorpo secundário *anti-rabbit* 800 (Li-Cor) 1:15000. O padrão de massa molecular relativa (Mr) utilizado foi <sup>TM</sup>Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa).

A ausência da proteína na cepa Fb7 poderia estar relacionada com a menor expressão do gene *xadA3*, uma vez que esta cepa é deficiente na percepção de DSF (fator de sinalização difusível) e tem o perfil de expressão gênica bastante

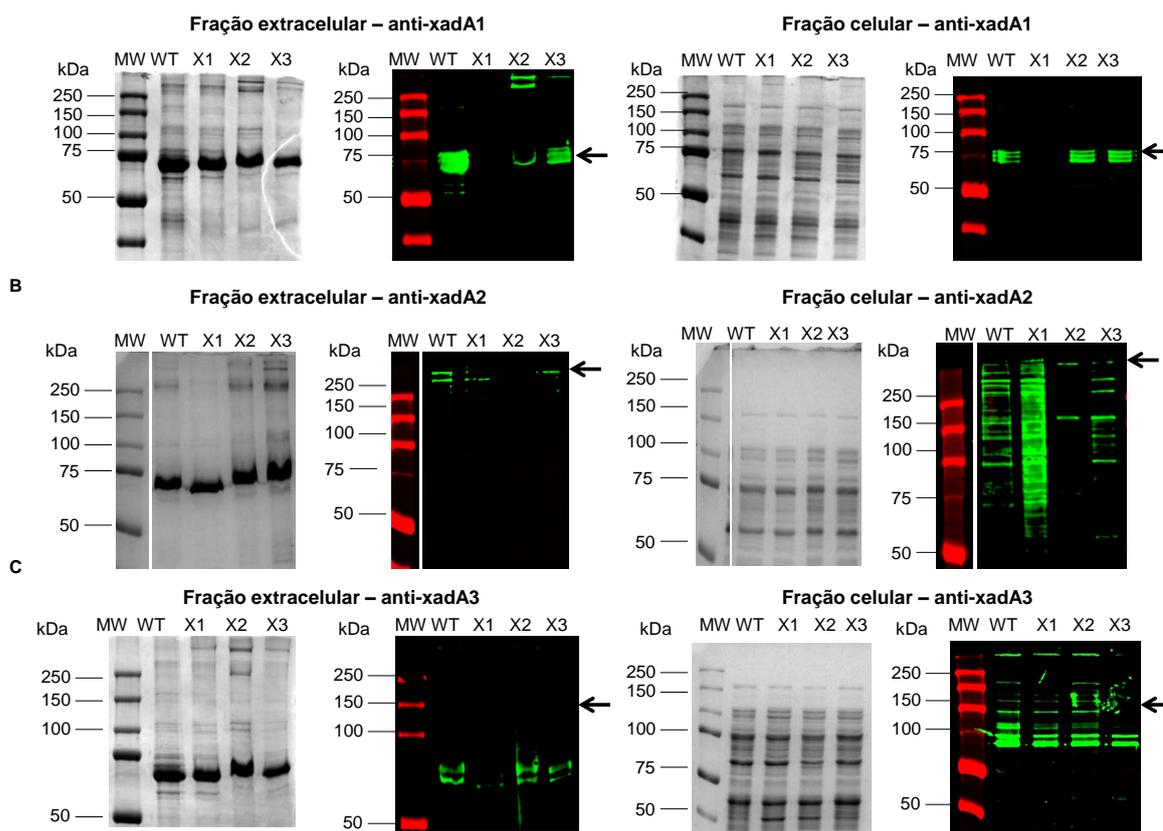
diferente de outras cepas de *X. fastidiosa* (Pierry, 2017). Fb7 apresenta uma mutação no gene que codifica RpfC que é o receptor de DSF (Ionescu *et al.*, 2013; Feitosa-Junior, 2017). Esta hipótese foi então confirmada através da análise de dados de transcritomas dessas 8 cepas totais obtidos por RNA-seq (Pierry, 2017) que revelaram que *xadA3* é sempre o transcrito mais abundante em cada transcrito, seguido de *xadA1* e *xadA2* com exceção da cepa Fb7, onde *xadA1* possui mais transcritos do que *xadA3* e *xadA2* (Figura 11). Além disso, a análise de expressão gênica diferencial (Figura 12) confirmou que os transcritos de *xadA3* são menos expressos na cepa Fb7 quando comparada as cepas Temecula e U24d. Já *xadA1* variou em todos os transcritomas analisados, sendo mais expresso na cepa Fb7 quando esta foi comparada com as demais cepas.



**Figura 11. Valores de expressão gênica por FPKM de *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* em 8 cepas de *X. fastidiosa*.** Os dados foram extraídos de análise de transcritomas completos das 8 cepas cultivadas em meio completo PWG ou meio mínimo PIM6 pelos tempos indicados (em dias) (Pierry, 2017).



que a proteína XadA2 é maior que XadA1 e XadA3 o que dificulta a detecção nos ensaios de *Immunoblotting*, pois tais proteínas ficam retidas no gel de empilhamento. Outro detalhe é que as XadAs por serem multímeros talvez sejam mais resistentes à desnaturação comprometendo sua migração em SDS-PAGE (Smolka *et al.*, 2003).

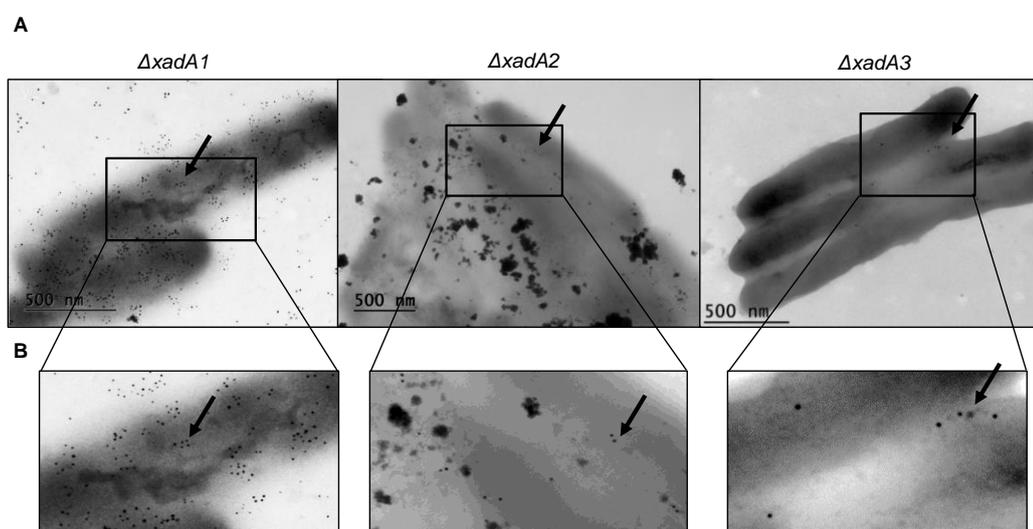


**Figura 13.** Detecção das XadAs extratos em proteicos da fração extracelular e de células (fração celular). Aliquotas de 10  $\mu$ g de proteínas da fração celular e extracelular de cultivos das cepas selvagem *Temecula* (WT) e mutantes de deleção para cada uma das *xadAs* (X1: $\Delta$ *xadA1*, X2:  $\Delta$ *xadA2* e X3: $\Delta$ *xadA3*) foram separadas em SDS-PAGE 10% seguindo-se coloração com Coomassie blue (à esquerda) e *Immunoblotting* (à direita) com o anticorpo (A) anti-*xadA1* 1:10.000, (B) anti-*xadA2* 1:400 e (C) anti-*XadA3* na diluição de 1:2000. A detecção foi realizada com anticorpo secundário fluorescente *anti-rabbit* 800 (Li-Cor) na diluição 1:15000. A imagem foi capturada no equipamento *Odyssey Infrared Imaging System*. O padrão de massa molecular relativa (MW) utilizado foi <sup>TM</sup> Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa). As setas à direita apontam a posição de migração da proteína detectada pelo anticorpo.

Na tentativa de determinar a localização celular das XadAs utilizamos a técnica de imunomarcção com ouro. Como não existe nenhum protocolo definido para *X. fastidiosa*, começamos a padronização do método com a primeira técnica

mostrada na figura 14, onde é possível visualizar a adesina XadA3 presente nas junções célula-célula. A segunda técnica testada está mostrada na figura 14, que mostra a imunomarcação da adesina XadA1 presente em toda a superfície da célula e também no meio extracelular, corroborando os descritos por (Caserta *et al.*, 2010; Ionescu *et al.*, 2014a) que identificaram a adesina XadA1 tanto na célula quanto no meio extracelular e associadas a vesículas de membrana externa (OMVs).

No entanto, a qualidade de nossos resultados de imunomarcação com partículas de ouro não foi satisfatória. Tanto o anticorpo anti-xadA2 (baixíssima titulação (1:400) como o anti-XadA3 não se mostraram adequados para este tipo de ensaio bem como o preparo de amostras não atendeu plenamente os objetivos iniciais.



**Figura 14. Tentativas de detecção das proteínas XadA1, XadA2 e XadA3 na cepa selvagem Temecula por Immunogold.** (A) Incubação com anti-xadA1 1:50 e anticorpo secundário anti-GAR10 1:20, com 3 horas de incubação; anti-xadA2 1:20 e anticorpo secundário anti-GAR10 1:50, com 3 horas de incubação; anticorpo primário anti-xadA3 1:50 e anticorpo secundário anti-GAR10 1:50, com 5 horas de incubação. (B) Aumento das imagens A, destacando as partículas de ouro. Não usado contrastante nas amostras. Imagens geradas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) à 200 kV.

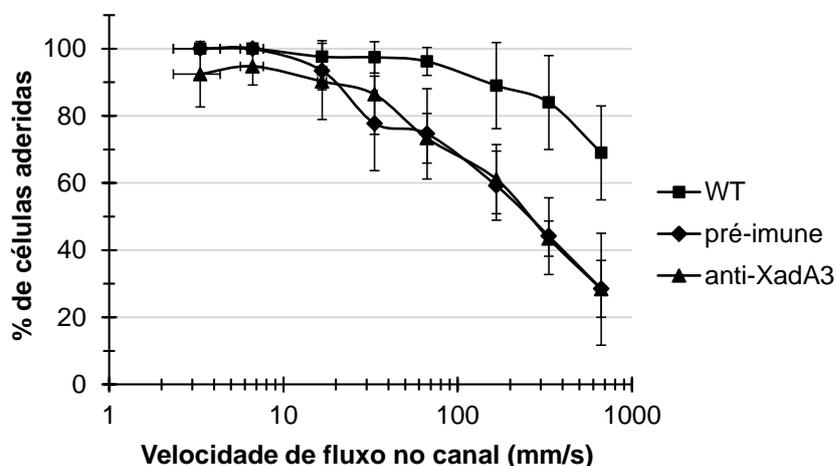
#### 4.4 Avaliação do efeito do anticorpo anti-XadA3 e de OMVs na adesão de *X. fastidiosa* sob condições de fluxo

##### 4.4.1 Anticorpo anti-XadA3

Para investigar em maior detalhe a adesão mediada por XadA3, avaliamos a capacidade do anticorpo policlonal anti-XadA3 interferir na adesão de células de *X.*

*fastidiosa* à superfície de câmaras de microfluídica e também na adesão intercelular. O anticorpo anti-XadA3 foi usado para hipoteticamente bloquear e interferir na adesão celular mediada por esta adesina e foi previamente incubado com as células antes que essas fossem injetadas nas câmaras. Os canais sujeitos a fluxo onde as células foram observadas foram desenhados para mimetizar as condições de fluxo que a bactéria encontra tanto no xilema (~5 mm/s) quanto no aparelho bucal do inseto (~500 mm/s).

O resultado obtido indica que o anticorpo anti-XadA3 não interfere na adesão das células à superfície (Figura 15). Essa observação é mais uma indicação de que as proteínas XadAs parecem não ser fundamentais para ancorar as células à superfícies. Como demonstração de que estes ensaios foram realizados de forma adequada, citamos os dados da adesina fimbrial de *X. fastidiosa* similar à MrkD. Neste caso foi observado que esta adesina de fímbrias tem importante papel na adesão inicial ao substrato, pois quando foi utilizado o anticorpo anti-MrkD, poucas células permaneceram aderidas a superfície comparativamente à adição de soro pré-imune (Paulo A. Zaini, comunicação pessoal).



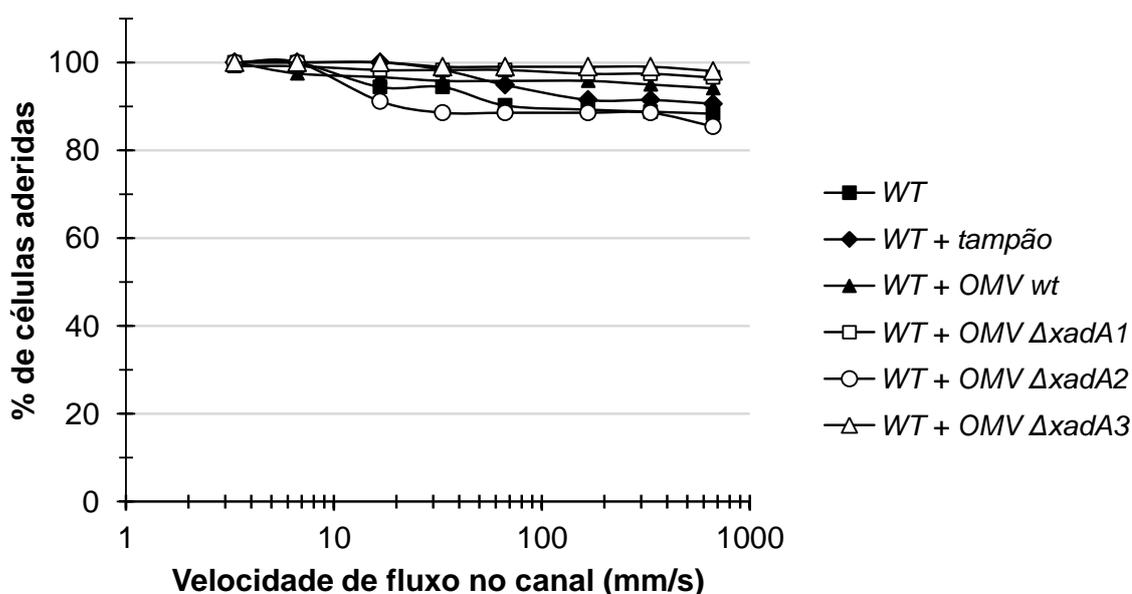
**Figura 15.** Avaliação da capacidade do anticorpo anti-XadA3 interferir na adesão de células de *X. fastidiosa* à superfície de câmaras de microfluídica. Dados de 4 réplicas biológicas. Em cada ensaio de 20 a 130 células foram acompanhadas individualmente.

#### 4.4.2 Vesículas de membrana externa (OMVs)

Investigamos se as OMVs poderiam interferir na adesão celular a superfícies assim como verificado em trabalho anterior, em que foi demonstrado que OMVs de *X. fastidiosa* parecem revestir os vasos do xilema e então facilitar a dispersão

sistêmica das células na planta (Baccari *et al.*, 2014). Para tal, avaliamos a capacidade de OMVs purificadas interferir na adesão de células de *X. fastidiosa* à superfície de câmaras de microfluídica e também na adesão intercelular. As OMVs isoladas de Temecula e de mutantes  $\Delta XadAs$  foram incubadas por 1 hora com as células antes que essas fossem injetadas na câmara de microfluídica, para hipoteticamente bloquear e interferir na adesão celular mediada por estas adesinas.

O resultado preliminar obtido indica que as OMVs, mesmo as preparações obtidas de células selvagens, parecem não interferir na adesão das células à superfície (Figura 16), ao contrário do esperado (Ionescu *et al.*, 2014b). Dessa forma, mais experimentos são necessários para avaliarmos seu papel das OMVs na adesão a superfícies.



**Figura 16.** Avaliação da capacidade das vesículas dos  $\Delta XadAs$  de interferir na adesão de células de *X. fastidiosa* à superfície de câmaras de microfluídica. Em cada ensaio de 100 a 250 células foram acompanhadas individualmente.

#### 4.5 Caracterização fenotípica dos mutantes $\Delta xadA1$ , $\Delta xadA2$ e $\Delta xadA3$

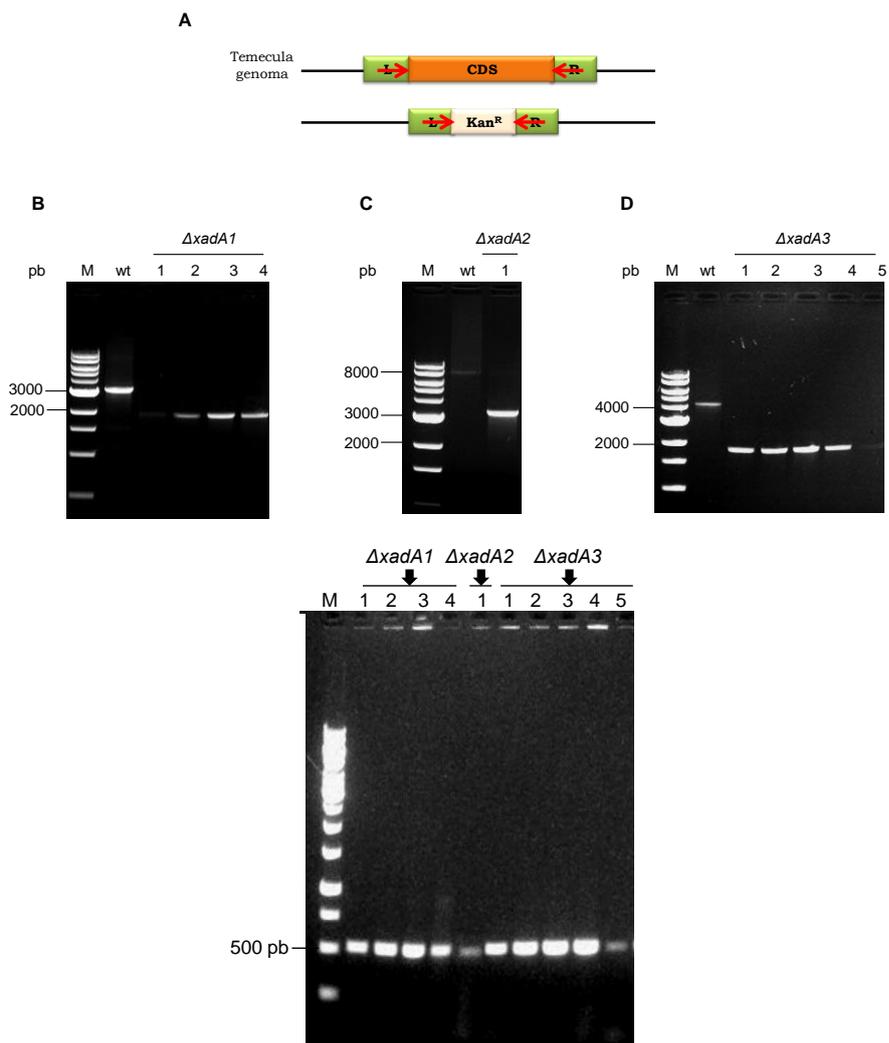
#### 4.5.1 Confirmação da deleção dos genes *xadA1*, *xadA2* e *xadA3*

As cepas mutantes  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  foram obtidas por substituição alélica por recombinação homóloga (item 3.2) utilizando-se a cepa Temecula, visto que a dificuldade de transformar a cepa 9a5c ainda não foi superada. Foram obtidos quatro clones mutantes  $\Delta xadA1$ , um  $\Delta xadA2$  e cinco  $\Delta xadA3$ , todos obtidas em eventos independentes de transformação natural com a construção plasmidial que possibilitou a troca de cada um dos *locus xadA* por um cassete de resistência a canamicina (item 3.2).

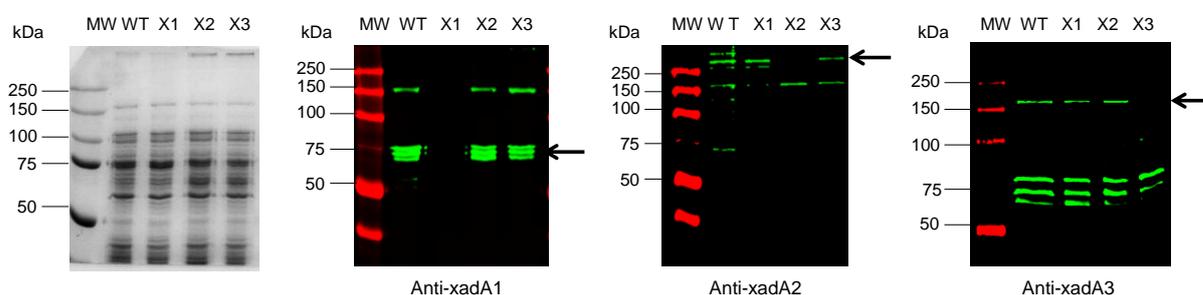
A deleção nos clones transformantes obtidos foi confirmada por PCR do DNA genômico purificado desses clones como esquematizado na Figura 17, utilizando-se pares de oligonucleotídeos (Tabela 2) flanqueando o gene *xadA1*, *xadA2* e *xadA3*, visando a geração de produtos com tamanho de ~3000 pb para *xadA1* na cepa selvagem e ~2000 pb nos mutantes, ~8000 pb para *xadA2* na cepa selvagem e ~2000 pb nos mutantes, e ~4200 pb para *xadA3* na cepa selvagem e ~3000 pb nos mutantes. O resultado do PCR com os *amplicons* na faixa de tamanho esperada para a cepa selvagem e para cada um dos clones mutantes, confirmando assim a troca alélica (Figura xx).

Os clones mutantes também foram genotipados utilizando os oligonucleotídeos Tem\_1959F e R para confirmar a identidade dos mutantes como derivados da cepa Temecula como mostrado na Figura 17.

A efetiva ausência dessas proteínas nas cepas mutantes foi adicionalmente confirmada com os anticorpos anti-XadA1, anti-XadA2 e anti-XadA3 (Figuras 18).



**Figura 17.** Genotipagem dos clones mutantes  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$ . Pares de oligonucleotídeos flanqueando os genes *xadA1*, *xadA2* e *xadA3* como esquematizado em A foram utilizados para confirmar as deleções (B). As cepas foram também genotipadas com um par de oligonucleotídeos para confirmar a identidade das cepas mutantes como derivadas da cepa Temecula (C). O marcador de tamanho de fragmentos de DNA (em pb) foi aplicado na canaleta M.



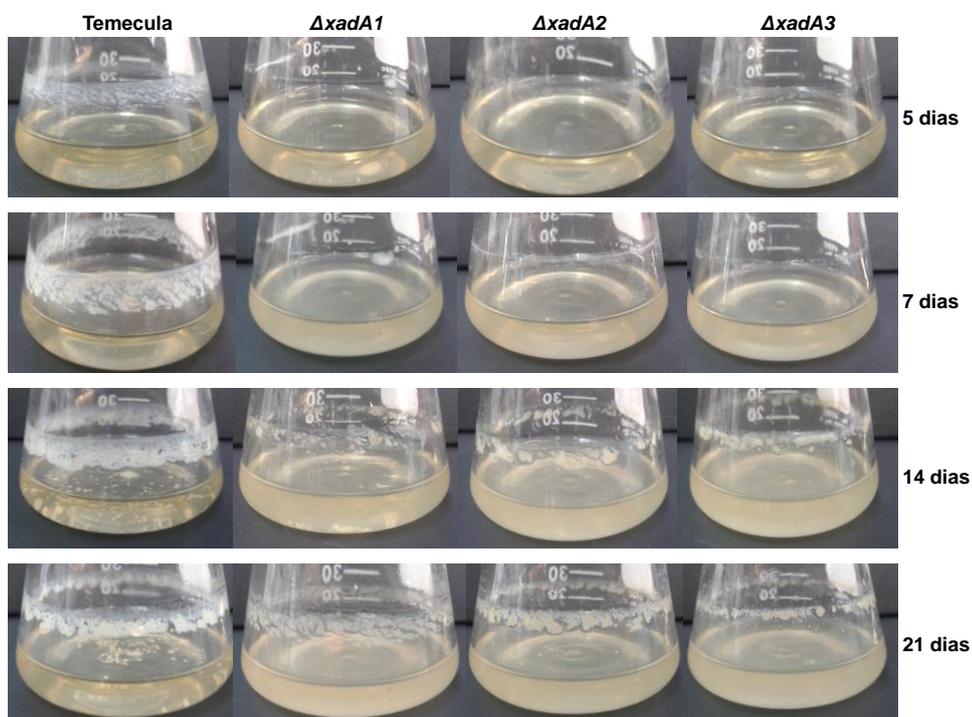
**Figura 18.** Confirmação dos mutantes  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  por *Immunoblotting*. Alíquotas de 10  $\mu$ g de extrato total da cepa selvagem Temecula e dos mutantes  $\Delta xadAs$  foram separadas em SDS-PAGE 10% seguindo-se coloração com Coomassie blue (à esquerda) e *Immunoblotting* (à direita) com o anticorpo: anti-xadA1 1:10.000, anti-xadA2 1:400 e anti-XadA3 na diluição de 1:2000. A detecção foi realizada com anticorpo secundário fluorescente *anti-rabbit* 800 (Li-Cor) na diluição 1:15000. A imagem foi capturada no equipamento *Odyssey Infrared Imaging System*. O padrão de massa molecular relativa (MW) utilizado foi <sup>TM</sup> Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa).

#### 4.5.2 Capacidade de formação de biofilme em vidro e plástico

Uma vez confirmada a obtenção dos mutantes  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  na cepa Temecula iniciamos os ensaios de caracterização *in vitro* de seu fenótipo. Apesar da dificuldade em se realizar curvas de crescimento para *X. fastidiosa*, observamos que o perfil para todos os mutantes foi similar, sendo que após o terceiro dia de cultivo pode-se observar a suposta fase exponencial. A fase estacionária foi atingida mesmo após 10-14 dias de cultivo (dados não apresentados).

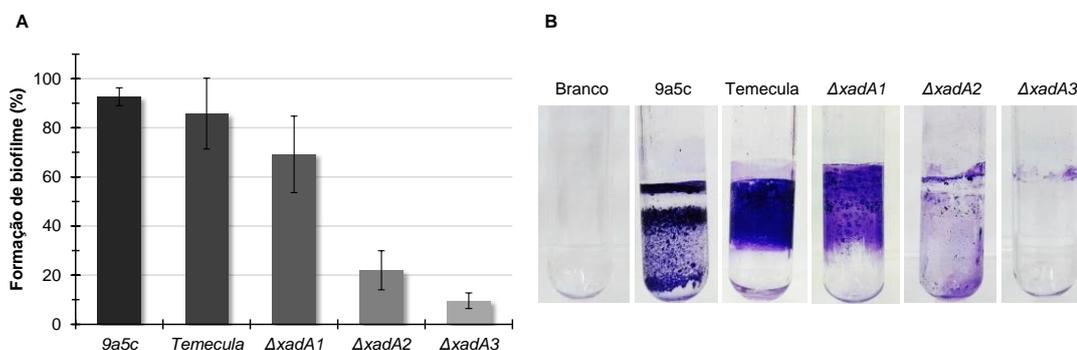
Foi realizada a análise do fenótipo de produção de biofilme para os mutantes  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  em comparação com a cepa selvagem Temecula em meio líquido (Figura 19). Observamos que a selvagem forma mais biofilme aderido ao vidro que os mutantes, sendo o mutante  $\Delta xadA3$  o que forma menos biofilme. Observamos também que o biofilme de Temecula é diminuído aos 21 dias, transição biofilme-planctônica, o que pode ser um indicativo de estágio tardio do biofilme, no qual ocorre dissipação de células ou ainda a população de células neste ponto pode

estar em decaimento (Danhorn & Fuqua, 2007; Flemming & Wingender, 2010a; Chagnot *et al.*, 2013).



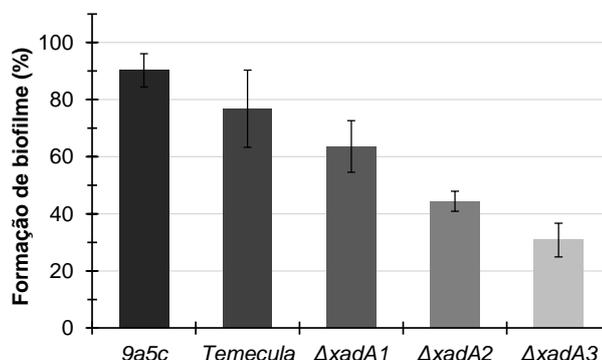
**Figura 19.** Ensaio de formação de biofilme. Os mutantes  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  e cepa selvagem Temecula foram cultivadas em meio PWG pelos tempos indicados.

O ensaio de formação de biofilme realizado em tubos de vidro está mostrado na Figura 20, onde fica evidente que o biofilme formado pela cepa Temecula selvagem é muito mais espesso que os dos mutantes  $\Delta xadA$ . Este dado foi confirmado pelo mesmo ensaio realizado em placa de 96 poços com um maior número de replicatas (Figura 21).



**Figura 20.** Formação de biofilme em tubos de ensaio. O biofilme formado nas paredes dos tubos de vidro contendo suspensão bacteriana das cepas 9a5c e Temecula e dos mutantes  $\Delta xadA$  crescidos

por 14 dias a 28°C 170 rpm foram coradas com 0,1% de cristal violeta. Após remoção do biofilme com SDS 1%, a absorbância a 595nm foi determinada (A). O experimento foi realizado em triplicata, sendo 3 réplicas biológicas. O biofilme formado pela cepa Temecula foi visualmente mais espesso do que o biofilme formado pelos mutantes  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  (B).



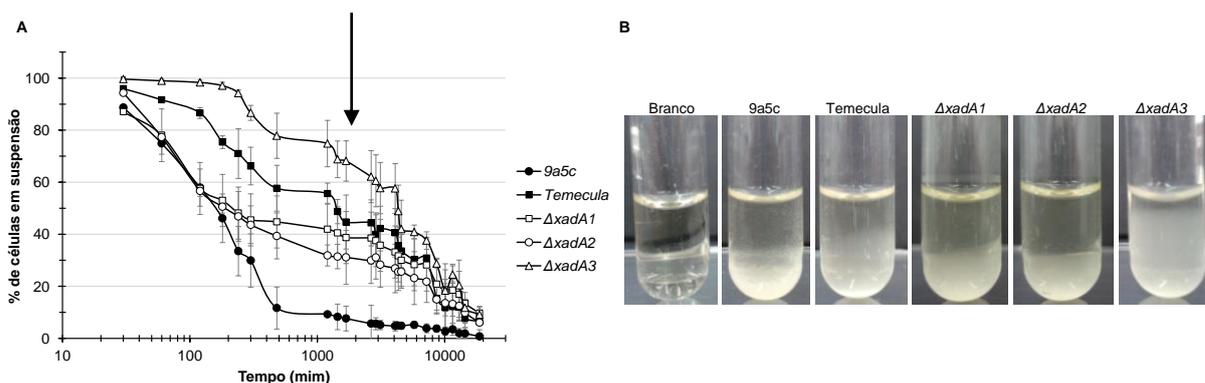
**Figura 21.** Formação de biofilme pela cepa Temecula e  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  de *X. fastidiosa* crescidas em placa de 96 poços. O biofilme formado nas paredes dos poços contendo suspensão bacteriana da cepa Temecula e os mutantes de XadA crescidos por 14 dias a 28°C 170 rpm em meio PWG foram coradas com 0,1% de cristal violeta. Após remoção do biofilme com SDS 1%, a absorbância a 595nm foi determinada. Para este experimento foram feitas 16 réplicas de cada cepa, sendo 3 réplicas biológicas.

A característica de redução da espessura do biofilme formado pelo mutante não é um fenótipo exclusivo dos mutantes  $\Delta xadAs$ , visto que mutantes para outras adesinas fimbriais e afimbriais também apresentaram redução na formação de biofilme (Kirkpatrick & Guilhabert, 2005; Feil *et al.*, 2007). Isso é relevante porque a formação de biofilme é um elemento chave na patogenicidade dessa bactéria (de Souza *et al.*, 2004). Ensaio em plantas com mutantes de algumas adesinas de *X. fastidiosa* mostram que a patogenicidade pode ser reduzida ou aumentada dependendo do gene deletado (Kirkpatrick & Guilhabert, 2005; Feil *et al.*, 2007).

#### 4.5.3 Ensaio de Aglutinação

O ensaio de aglutinação foi realizado para avaliar se as adesinas autotransportadoras triméricas possuem papel na adesão célula-célula. A Figura 22 mostra a aglutinação celular das cepas 9a5c, Temecula,  $\Delta xadA1$ ,  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  ao longo do tempo, onde podemos observar que o mutante  $\Delta xadA3$  aglutina muito menos que a cepa selvagem. Esse dado confirma o fenótipo observado para o mutante na Figura 19, onde o meio é mais turvo, com mais células dispersas

(planctônicas) e pouca formação de biofilme. A cepa 9a5c tende a formar grumos, um indicativo de que a adesão célula-célula é expressiva para essa cepa. Os mutantes  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$  agregaram um pouco mais que a cepa selvagem no início da curva mas após 1000 minutos praticamente não há diferença entre Temecula e os três mutantes são bem semelhantes.



**Figura 22.** Ensaio de aglutinação de cepas de *X. fastidiosa*. (A) Porcentagem de células em suspensão das cepas 9a5c e Temecula e dos mutantes  $\Delta xadA$  mantidas em meio líquido. A seta indica o ponto correspondente a 24 horas após o início do experimento. (B) Fenótipo de aglutinação das cepas de *X. fastidiosa* no ponto 24 horas. Três réplicas biológicas (com triplicata técnica em cada) foram avaliadas.

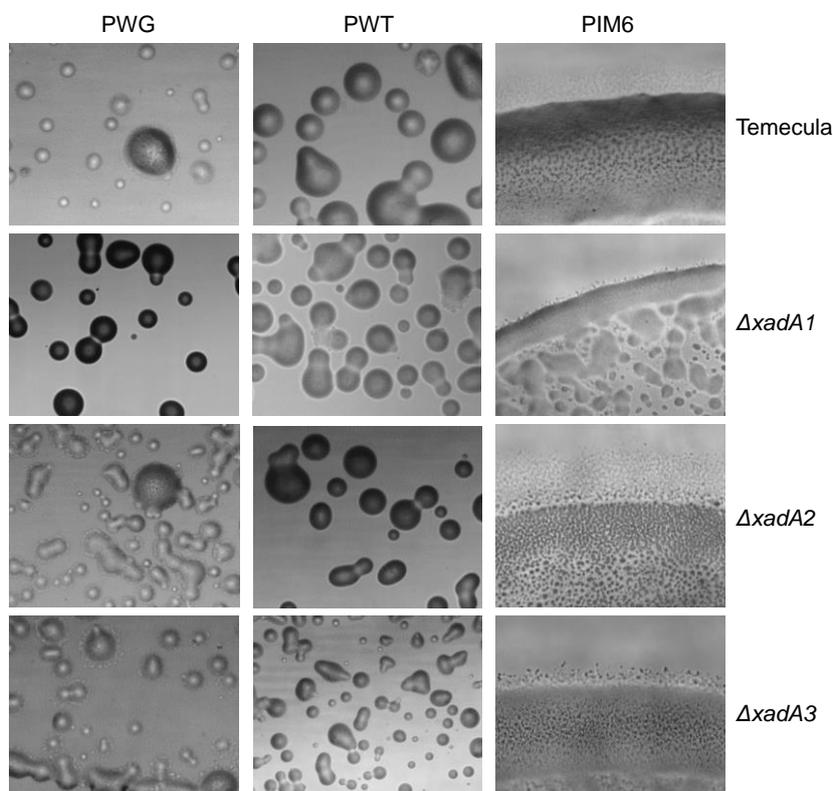
Ainda que o mutante  $\Delta xadA3$  apresente redução na capacidade de agregação nas condições testadas, não podemos desconsiderar a possibilidade de que o mutante exiba expressão aumentada de outras adesinas para compensar a deleção de *xadA3*. Efeito desta natureza parece ocorrer com o mutante  $\Delta xadA1$  (A.M. da Silva & M. Ionescu, dados não publicados). Essa talvez seja a explicação para o efeito observado com os mutantes  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$  que agregam mais que a cepa selvagem (Figura 22).

Tanto os dados observados nas culturas celulares em meio líquido quanto os do ensaio de aglutinação e formação de biofilme mostram que a adesina XadA3 possui um papel importante na agregação célula-célula e conseqüentemente no desenvolvimento e formação do biofilme, pois quando este gene é deletado essas características são visivelmente reduzidas.

#### 4.5.4 Motilidade celular

Avaliamos se a ausência das XadAs afetaria a motilidade celular mediada por contato com a superfície, a *twitching motility*. Observamos que o mutante  $\Delta xadA2$  apresentou maior franja (na periferia da colônia bacteriana) em meio PIM6, meio mínimo que mimetiza a seiva do xilema (Pierry, 2017), seguido pelo mutante  $\Delta xadA3$  (Figura 23). Em PWT não houve aparecimento de franja em nenhuma cepa, provavelmente porque a albumina presente neste meio de cultura é um inibidor de motilidade do tipo *twitching* (Galvani *et al.*, 2007).

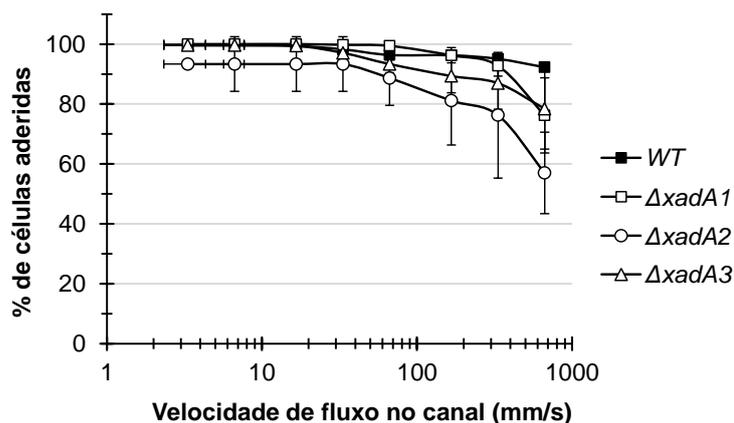
Em meio PWG os mutantes  $\Delta xadA2$  e  $\Delta xadA3$  apresentaram franja, menor que no meio PIM6. Temecula apresentou poucas colônias contendo franja, um forte indicativo de que estas células não estavam se movimentando. O meio PWG por ser um meio rico provavelmente acaba inibindo a motilidade celular, pois as células não precisam se locomover para conseguir mais nutrientes. Contudo, o meio PIM6, meio mínimo, tem seus nutrientes esgotados rapidamente pelas células estimulando que as mesmas migrem via *twitching motility* (Pierry, 2017).



**Figura 23.** Motilidade celular de Temecula e mutantes  $\Delta xadAs$  em três meios de cultivo. As cepas indicadas foram cultivadas em meio sólido por 7 dias, 28°C e as colônias foram visualizadas em lupa.

#### 4.5.5 Adesão à superfície sob condições de fluxo

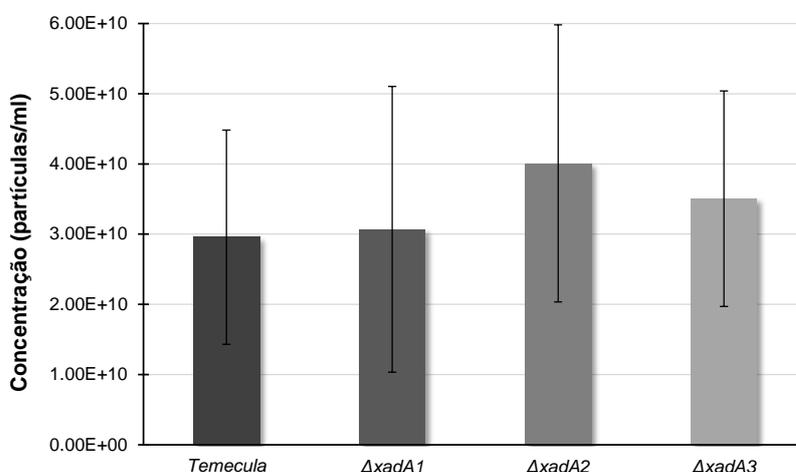
Os resultados dos ensaios de aglutinação indicam que XadA3 possui papel relevante na adesão célula-célula, diferentemente de XadA1 e XadA2. Analisamos então se estas adesinas contribuem para a adesão à superfície sob condição de fluxo. Para mimetizar as condições de fluxo que a bactéria encontra tanto no xilema quanto no aparelho bucal do inseto, foram utilizadas câmaras de microfluídica (Meng *et al.*, 2005; De la Fuente *et al.*, 2007c; Ionescu *et al.*, 2014a{Meng, 2005 #529). Os resultados mostrados na Figura 24 indicam que as três adesinas não são determinantes na adesão inicial à superfície. Contudo, foi observada uma grande variação entre as réplicas biológicas o que pode estar relacionado a quantidade de células inicialmente aderidas à superfície das câmaras de microfluídica. Quanto maior o número de células, menor é a porcentagem de células lavadas pelo aumento do fluxo, indicando forte influência à adesividade inicial no restante do experimento. Mesmo ajustando a  $DO_{600nm}$  da suspensão de células injetada nas câmaras, ainda há variação nesse número inicial de células que aderem à superfície de vidro. A partir dessa observação, mais réplicas serão feitas buscando um conjunto de dados com menor interferência desse fator. Os resultados nas câmaras serão importantes para nos dar mais indícios da função dessas adesinas. De todo modo, os resultados obtidos até o momento, sugerem que as três XadAs, nessas condições, não parecem desempenhar papel determinante na adesão inicial ao substrato, reforçando seu papel na estruturação do biofilme de *X. fastidiosa* como já verificado anteriormente (Caserta *et al.*, 2010; Chatterjee *et al.*, 2010).



**Figura 24.** Adesão ao substrato sob condições de fluxo crescentes. Quatro réplicas biológicas foram analisadas. Em cada ensaio uma média de 50 células das cepas indicadas (selvagens e mutantes  $\Delta xadA$ ) foram acompanhadas individualmente.

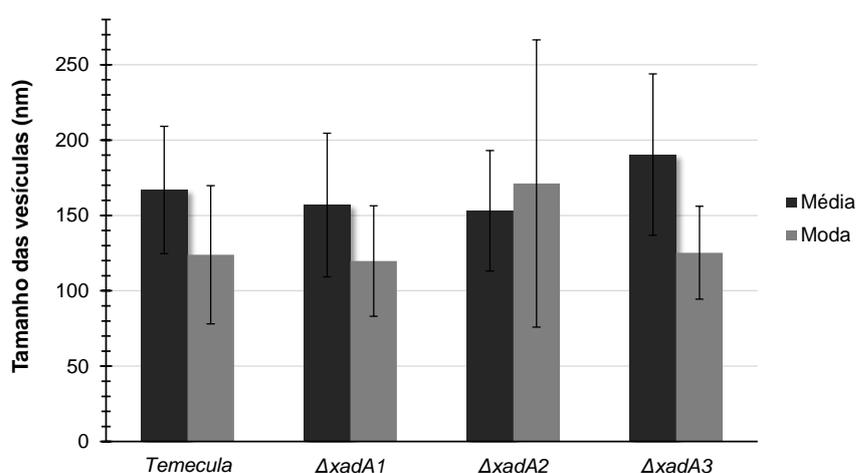
#### 4.5.6 Produção de OMVs

A produção de OMVs pelos três mutantes  $\Delta xadA$  foi quantificada pela análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA). Os resultados mostrados na Figura 25 sugerem que o mutante deleção da adesina XadA2 produz mais OMVs/mL do que a cepa selvagem. O mutante  $\Delta xadA3$  também parece produzir mais OMVs/mL enquanto que para  $\Delta xadA1$  a produção de OMVs é pouco alterada. Será necessário repetir estes ensaios pois tivemos muitas variações entre as replicatas biológicas, mas os dados preliminares sugerem que a adesina XadA2, que é o maior TAA de *X. fastidiosa* deve ter um papel importante na estabilidade da membrana externa.



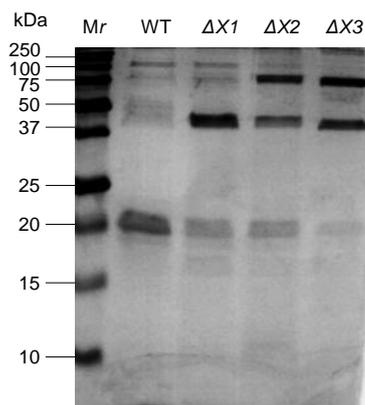
**Figura 25.** Quantificação da produção de OMVs pela cepa Temecula e pelos mutantes  $\Delta xadA$ . Quatro réplicas biológicas foram analisadas.

O tamanho das OMVs entre 100 e 200 nm medido em nossos ensaios (Figura 26) se equipara aos tamanhos já verificados para vesículas *X. fastidiosa* (Ionescu *et al.*, 2014a). Apesar das OMVs do mutante  $\Delta xadA3$  apresentarem a mais alta média, a maioria de suas OMVs são tem ~125 nm. Já  $\Delta xadA2$  possui as maiores vesículas, com cerca de 170 nm. Já o tamanho das OMVs de  $\Delta xadA1$  se assemelha com o observado para a cepa selvagem.



**Figura 26.** Tamanho das OMVs produzidas pela cepa Temecula e pelos mutantes  $\Delta xadA$ . A média (barras em cinza-escuro) e moda (barras em cinza-claro) dos tamanhos de OMVs secretadas pelas cepas indicadas cultivadas por 7 dias em meio PWG. Quatro réplicas biológicas foram analisadas

Além da diferença na quantidade e tamanho das OMVs produzidas pelos mutantes  $\Delta xadA$ , seus respectivos perfis proteicos em SDS-PAGE também parecem ser diferentes (Figura 27). Esses resultados embasam a ideia de futuramente realizarmos proteômica *shotgun* para uma análise completa da composição proteica das OMVs dos mutantes  $\Delta xadA$ .



**Figura 27.** Perfil de polipeptídeos das OMVs isoladas da cepa Temecula e dos três mutantes  $\Delta xadA$ . As OMVs purificadas foram submetidas a SDS-PAGE/poliacrilamida 15%, seguindo-se coloração com Coomassie blue. A imagem foi capturada no fotodocumentador. O padrão de massa molecular relativa (Mr) utilizado foi <sup>TM</sup> Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa).

#### 4.5.7 Perfil de expressão gênica global

Avaliamos se a deleção dos genes *xadA* teria algum efeito, ainda que pouco provável, no perfil de expressão gênica global de *X. fastidiosa*. Para tal, o RNA total da cepa Temecula (WT) e dos três mutantes  $\Delta xadA$  cultivadas por 7 dias em meio PWG foi extraído para realização de RNA-seq.

Após as análises de qualidade e pureza, as preparações de RNA de duplicatas biológicas (cultivos independentes) de cada cepa foram submetidas ao protocolo de depleção do rRNA e as frações enriquecidas em mRNAs foram utilizadas para a confecção de bibliotecas de cDNA para RNA-seq (item 3.27). As oito bibliotecas de fragmentos de cDNA foram combinadas e sequenciadas no equipamento *MiSeq* (*Illumina*) utilizando-se a estratégia de *Paired-End* com o kit para 500 ciclos, que resulta em sequências pareadas de 250 bases (item 3.30). O rendimento da corrida de sequenciamento foi de 4,904,410 *reads* gerados dos quais >73,5% tinham boa qualidade média ( $\geq Q30$ ). O rendimento ficou bem abaixo do esperado (~30% de rendimento) possivelmente devido a baixa concentração das bibliotecas de cDNA aplicadas no sequenciador.

Os conjuntos de *reads* obtidos para as cepas WT e mutantes *xadAs* foram mapeados contra o genoma referência da cepa Temecula (Van Sluys *et al.*, 2003) utilizando-se o software *CLC Genomics Workbench*. O primeiro mapeamento indicou contaminação com sequências de rRNA em algumas das bibliotecas de cDNA, a

qual foi removida computacionalmente (Schmieder *et al.*, 2012). Embora a etapa de depleção do rRNA tenha sido aparentemente bem sucedida, a persistência de contaminação não é infrequente em experimentos de RNA-seq (Conesa *et al.*, 2016). Na Tabela 11 estão mostradas as métricas do mapeamento das *reads* no genoma de referência e o rendimento das bibliotecas sequenciadas, após a remoção das sequências de rRNA contaminantes.

**Tabela 11.** Mapeamento de *reads* das bibliotecas de RNA-seq no genoma referência.

Biblioteca		Estatísticas do mapeamento		
Cepa	Réplica	Total de <i>Reads</i>	% de <i>Reads</i> mapeados	Distância em bases entre <i>paired reads</i>
WT	1	429.802	77.91	35-251
WT	2	736.878	66.91	35-251
$\Delta xadA1$	1	914.258	81.5	35-251
$\Delta xadA1$	2	1,102,326	76.45	35-251
$\Delta xadA2$	1	711.474	80.25	35-251
$\Delta xadA2$	2	943.312	86.05	35-251
$\Delta xadA3$	1	1,415,146	79.18	35-251
$\Delta xadA3$	2	754.926	78.89	35-251

A correlação de Pearson entre as duas réplicas biológicas de cada cepa extraída a partir de valores de FPKM (Tabela 12) também foi abaixo do que é aceito neste tipo de ensaio ( $>0,7$ ), mas certamente reflete variações inerentes ao cultivo de *X. fastidiosa* (ex: multiplicação lenta, formação de biofilme). Idealmente teríamos que realizar novos experimentos para aumentar o número de réplicas biológicas. Com essas ressalvas, consideramos que as análises subsequentes deveriam ser realizadas e assim inspecionarmos eventuais alterações nos transcritomas dos mutantes  $\Delta xadA$  em relação a cepa selvagem.

**Tabela 12.** Valores de correlação de Pearson entre réplicas biológicas baseados nos valores de FPKM.

Cepa	Réplicas biológicas	Correlação de Pearson baseada nos valores de FPKM
Temecula (WT)	T_rep1 x T_rep2	0.74923
$\Delta xadA1$	X1_rep1 x X1_rep2	0.507077
$\Delta xadA2$	X2_rep1 x X2_rep2	0.562009
$\Delta xadA3$	X3_rep1 x X3_rep2	0.529561

A análise de dados de RNA-seq obtidos com duas réplicas biológicas são aceitáveis, desde que os experimentos sejam realizados de forma bem controlada para que a variabilidade esperada entre as réplicas seja baixa de modo a ficarem evidentes as diferenças entre transcritomas que serão comparados (Park *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). Por outro lado, embora o número mínimo ideal de réplicas biológicas em experimentos de RNA-seq seja três para Conesa *et al.* (2016) e seis para Schurch *et al.* (2016), este último autor demonstra que, para números menores de réplicas, a ferramenta computacional DESeq2 (Love *et al.*, 2014) é a que tem melhor desempenho e precisão para identificação de genes diferencialmente expressos, minimizando a identificação de falsos positivos.

Assim, utilizamos a ferramenta DESeq2 na comparação dos transcritomas, usando como critério de seleção de genes diferencialmente expressos entre 2 cepas o *p* valor de 0,05. As tabelas 13, 14 e 15 mostram os genes identificados como diferencialmente expressos segundo esse critério. Da lista de genes diferencialmente expressos, a maioria parece ter níveis de transcritos aumentados nos mutantes em relação a cepa selvagem. Chama atenção, que entre os transcritos com maior nível de expressão diferencial estão as esterases/lipases PD1702 e PD1703 nos três mutantes  $\Delta xadA$ . PD1703 codifica a esterase/lipase LesA que parece atuar na degradação do tecido vegetal e, seu acúmulo nas regiões foliares, foi associado com os sintomas da doença de Pierce de videiras (Nascimento *et al.*, 2016). Outra observação que vale comentar é que os transcritos de XadA1 aparecem em maior abundância na cepa selvagem comparada ao mutante  $\Delta xadA1$ , como esperado.

**Tabela 13.** Genes diferencialmente expressos entre as cepas selvagem (WT) e  $\Delta xadA1$

CDS	Nome do produto gênico	Fold change (escala linear)	<i>p</i> valor ≤ 0.05
XFTem_00822	Autotransporter adhesin (XadA1)	19.5	0.03
XFTem_01093	hypothetical protein	-13.7	0.04
XFTem_01965	hypothetical protein (PD1702)	-17.5	0.01
XFTem_01966	Esterase/lipase (PD1703)	-35.4	0.00

Tabela 14. Genes diferencialmente expressos entre as cepas selvagem (WT) e  $\Delta xadA2$ 

CDS	Nome do produto gênico	Fold change (escala linear)	p valor $\leq 0.05$
XFTem_00904	6S / SsrS RNA ( miscRNA ) (XFTem_gi28197945.1: 2519802bp)	40.0	4E-06
XFTem_01636	monothiol glutaredoxin, Grx4 family	11.0	4E-07
XFTem_00379	Bacterial RNase P class A ( miscRNA ) (XFTem_gi28197945.1: 2519802bp)	8.0	0.04
XFTem_01973	Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins	-5.4	0.01
XFTem_02319	ribosomal protein S7, bacterial/organelle	-5.8	0.05
XFTem_00970	Zn-dependent oligopeptidases ( EC:3.4.15.5 )	-6.4	0.01
XFTem_02274	ribosomal protein S2, bacterial type	-6.7	0.01
XFTem_00503	Ribosomal protein L5	-6.8	0.04
XFTem_02244	succinyl-CoA synthetase, beta subunit ( EC:6.2.1.5 )	-6.8	0.04
XFTem_00496	ribosomal protein L22, bacterial type	-6.9	0.05
XFTem_01756	Cell wall-associated hydrolases (invasion- associated proteins)	-8.1	0.04
XFTem_02323	ribosomal protein L7/L12	-8.3	0.03
XFTem_00493	Ribosomal protein L23	-8.3	0.02
XFTem_00515	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit, bacterial and chloroplast-type ( EC:2.7.7.6 )	-8.6	0.00
XFTem_00558	hypothetical protein	-8.6	0.02
XFTem_02239	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain	-8.9	0.04
XFTem_01778	chaperonin GroL	-10.2	4E-07
XFTem_01234	hypothetical protein	-11.3	6E-05
XFTem_00068	P pilus assembly protein, pilin FimA	-14.3	2E-06
XFTem_00354	hypothetical protein	-14.4	2E-05
XFTem_00614	hypothetical protein	-17.6	3E-08
XFTem_00559	hypothetical protein	-18.8	0.00
XFTem_02438	Predicted membrane protein	-19.4	5E-07
XFTem_02103	Outer membrane protein W	-20.9	2E-10
XFTem_01965	hypothetical protein (PD1702)	-23.4	3E-05
XFTem_01966	Esterase/lipase (PD1703)	-62.9	2E-10

Tabela 15. Genes diferencialmente expressos entre as cepas selvagem (WT) e  $\Delta xadA3$ .

CDS	Nome do produto gênico	Fold change (escala linear)	p valor $\leq 0.05$
XFTem_00904	6S / SsrS RNA ( miscRNA ) (XFTem_gi28197945.1: 2519802bp)	36.2	5E-07
XFTem_01636	monothiol glutaredoxin, Grx4 family	13.8	2E-05
XFTem_00379	Bacterial RNase P class A ( miscRNA ) (XFTem_gi28197945.1: 2519802bp)	8.6	1E-02
XFTem_01491	Molecular chaperone (small heat shock protein)	5.4	5E-02
XFTem_02103	Outer membrane protein W	-5.9	4E-02
XFTem_00513	30S ribosomal protein S11	-6.0	5E-02
XFTem_01687	ribosomal protein S1	-6.1	2E-02
XFTem_01939	S-adenosylmethionine synthetase ( EC:2.5.1.6 )	-6.4	5E-02
XFTem_00498	ribosomal protein L16, bacterial/organelle	-7.6	2E-02
XFTem_00491	50S ribosomal protein L3, bacterial	-7.8	1E-02
XFTem_02319	ribosomal protein S7, bacterial/organelle	-8.1	2E-02
XFTem_02365	Putative multicopper oxidases ( EC:1.10.3.3 )	-8.1	5E-02
XFTem_02438	Predicted membrane protein	-8.4	2E-02
XFTem_00970	Zn-dependent oligopeptidases ( EC:3.4.15.5 )	-8.8	2E-02
XFTem_00962	Chemotaxis protein histidine kinase and related kinases	-8.9	2E-02
XFTem_00502	ribosomal protein L24, bacterial/organelle	-9.3	1E-02
XFTem_00512	30S ribosomal protein S13	-9.6	4E-03
XFTem_01234	hypothetical protein	-11.1	4E-03
XFTem_01010	Holliday junction DNA helicase, RuvA subunit ( EC:3.6.4.12 )	-11.4	4E-03
XFTem_00560	hypothetical protein	-14.9	6E-04
XFTem_00496	ribosomal protein L22, bacterial type	-17.2	3E-04
XFTem_00493	Ribosomal protein L23	-17.4	3E-04
XFTem_00515	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit, bacterial and chloroplast-type ( EC:2.7.7.6 )	-19.1	5E-05
XFTem_02313	Cold shock proteins	-22.2	9E-07
XFTem_00503	Ribosomal protein L5	-24.4	7E-06
XFTem_00558	hypothetical protein	-34.3	2E-09
XFTem_01093	hypothetical protein	-35.1	1E-04
XFTem_01965	hypothetical protein (PD1702)	-50.7	2E-05
XFTem_00592	hypothetical protein	-52.3	1E-04
XFTem_00559	hypothetical protein	-62.8	1E-08
XFTem_01966	Esterase/lipase (PD1703)	-172.6	1E-09

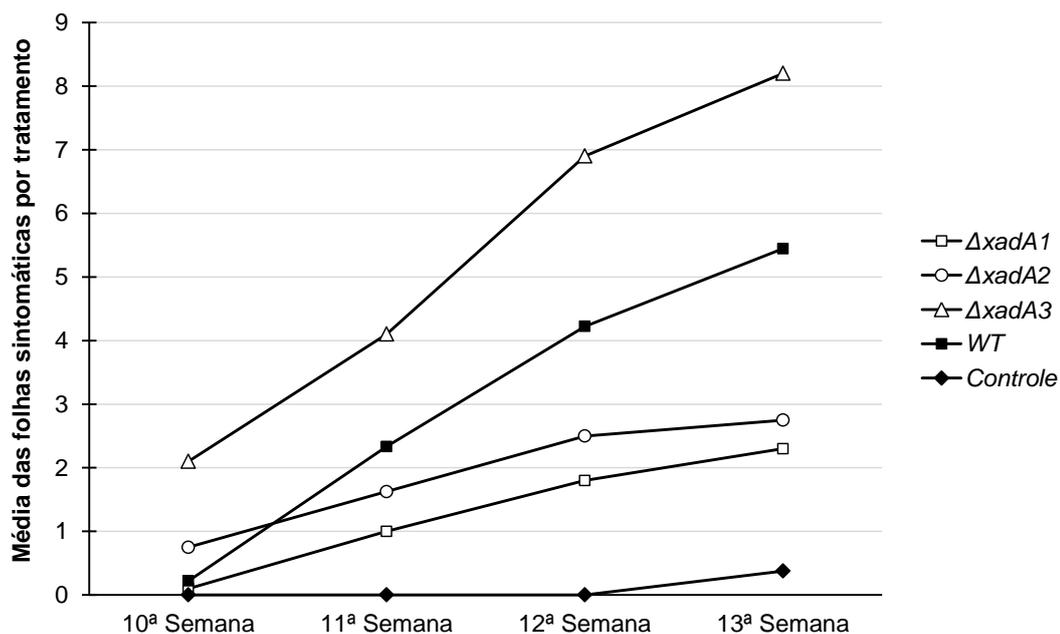
A comparação entre os transcritomas das cepas mutantes  $\Delta xadA$  revelou pouquíssimos genes diferencialmente expressos, sendo que a comparação  $\Delta xadA1$  x  $\Delta xadA3$  não apresentou nenhum gene sendo mais ou menos expresso, mesmo quando o critério para a comparação foi aumentado para o  $p$  valor de 0,1. Observamos níveis aumentados dos transcritos de XadA1 no mutante  $\Delta xadA2$  na comparação com  $\Delta xadA1$ . Será importante averiguar se de fato ocorre um aumento real nos níveis proteicos de XadA1 nesse mutante para compensar a falta da adesina XadA2.

O conjunto de dados de RNA-seq será futuramente mais explorado com outros tipos de análises antes da decisão de refazer estes experimentos.

#### 4.5.8 Virulência em videiras e transmissão inseto-planta

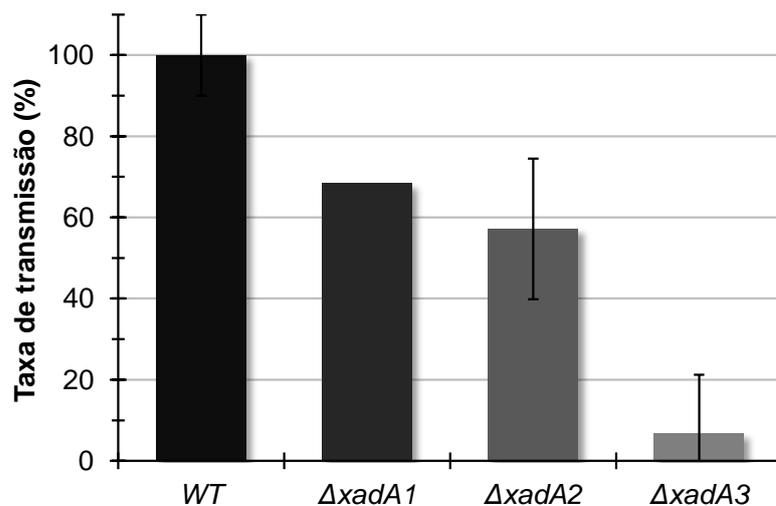
O fenótipo de virulência dos três mutantes  $\Delta xadA$  foi avaliado pela inoculação mecânica dessas células em videiras e acompanhamento do aparecimento de folhas sintomáticas após 10 semanas da infecção. O gráfico da Figura 28 mostra que a infecção com  $\Delta xadA3$  resultou em maior número de folhas sintomáticas (1,5 – 2,8 vezes) em relação à Temecula selvagem, o que pode ser considerado um fenótipo hipervirulento. Nossa hipótese é que o mutante  $\Delta xadA3$  se disperse com maior eficiência pela planta, uma vez que a adesina XadA3 que é importante para a adesão célula-célula e formação de biofilme. Além disso, como discutido anteriormente, esse mutante parece ter níveis aumentados dos transcritos de LesA um importante fator de virulência de *X. fastidiosa* (Nascimento *et al.*, 2016).

Por outro lado, as plantas inoculadas com os outros dois mutantes,  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$ , apresentaram um número menor de folhas sintomáticas (0,8 – 3 vezes) quando comparados à cepa selvagem. A hipótese, é que a deleção desses genes possa ter resultado na superexpressão outras adesinas para compensar a falta dessas proteínas de membrana externa que são relativamente abundantes, o que resultaria na formação de um biofilme mais denso *in planta* e conseqüentemente menor disseminação sistêmica. Nesse cenário as células ficariam retidas mais próximas ao ponto de inoculação, gerando número menor de folhas sintomáticas.



**Figura 28.** Ensaio de patogenicidade da cepa Temecula e dos mutantes *xadAs* em videiras. Cada uma das cepas indicadas foram inoculadas mecanicamente em 12 plantas de videiras (*Vitis vinifera* variedade Cabernet Sauvignon) mantidas em casa de vegetação. O número de folhas sintomáticas (perda de clorofila e morte marginal das folhas) foi avaliado 10, 11, 12 e 13 semanas após inoculação. Esse ensaio foi realizado no laboratório do Prof. Steven Lindow na Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA tendo sido repetido por duas vezes, apresentado o mesmo perfil.

Para verificar se as XadAs tem papel na transmissão da bactéria do inseto para a planta foi realizado um ensaio de transmissão como descrito no item 3.33. O gráfico da Figura 29 mostra que o mutante  $\Delta xadA3$  é claramente deficiente na transmissão do inseto para planta, enquanto que os mutantes  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$  não parecem ser afetados nesse processo. Um possível explicação é que a retenção do mutante  $\Delta xadA3$  no aparelho bucal do inseto é menos eficiente que as dos mutantes  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$ , reduzindo assim a chance de sua transmissão para a planta. Nesse caso, possivelmente as células bacterianas não são retidas na parte anterior do aparelho bucal do inseto, e seriam, portanto digeridas pelo inseto.



**Figura 29.** Ensaio de transmissão da cepa Temecula e dos mutantes *xadAs* do inseto-vetor para planta. A primeira etapa do ensaio é aquisição das cepas pelo inseto-vetor (*Graphocephala atropunctata*) e para isto os insetos foram alimentados em dispositivo de dieta artificial com as cepas indicadas por três dias. Em seguida ocorreu a etapa de transmissão, onde os insetos foram colocados em telado juntamente com plântulas saudáveis por um período de 7 dias, para que estes pudessem se alimentar do xilema das plântulas e assim transmitir a bactéria. A avaliação da colonização dos insetos e das plântulas foi realizada por contagem de colônias e PCR. Esse ensaio foi realizado no laboratório do Prof. Steven Lindow na Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA tendo sido repetido por duas vezes.

Nossos resultados mostraram claramente que o mutante  $\Delta xadA3$  tem reduzida capacidade de agregação celular e formação de biofilme quando comparado tanto aos mutantes  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$  como a cepa selvagem Temecula, embasando a hipótese corrente de que para que *X. fastidiosa* sobreviva, se multiplique e seja transmitida é necessário que ela forme biofilme tanto no xilema como no inseto (Chatterjee *et al.*, 2008a; Killiny & Almeida, 2009b; Caserta *et al.*, 2010). Para que ocorra a formação do biofilme é preciso que a célula esteja bem aderida à superfície e que haja agregação destas células. Portanto, a adesina XadA3 se mostra fundamental para *X. fastidiosa* se propagar com eficiência entre seus hospedeiros vegetais.

## 5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, tivemos como objetivo caracterizar bioquímica e funcionalmente a proteína XadA3 e obter informações adicionais sobre o papel desempenhado por XadA1 e XadA2 na adesão e virulência de *X. fastidiosa*.

Utilizando imunodeteção com um anticorpo policlonal anti-XadA3, demonstramos que essa proteína localiza-se na superfície bacteriana e medeia a adesão intercelular.

A caracterização dos fenótipos de mutantes de deleção de cada um dos genes das três adesinas XadA está resumida na Tabela 17. Estes experimentos revelaram que o mutante  $\Delta xadA3$  tem reduzida capacidade de agregação celular e formação de biofilme quando comparado tanto aos mutantes  $\Delta xadA1$  e  $\Delta xadA2$  como à cepa selvagem Temecula.

**Tabela 17.** Características fenotípicas dos  $\Delta XadA$ s em comparação a cepa selvagem.

Fenótipo	Temecula	$\Delta xadA1$	$\Delta xadA2$	$\Delta xadA3$
Formação de biofilme	++++	+++	++	+
Aglutinação	++	+++	+++	+
Motilidade celular em placa (PWG)	+	-	+	++
Motilidade celular em placa (PIM-6)	+	-	++	+
Motilidade celular em placa (PWT)	-	-	-	-
Adesão à superfície sob condições de fluxo	+++	++++	+	++
Formação de vesículas	+	++	++++	+++
Tamanho das vesículas (moda)	+	+	+++	++
Capacidade de transmissão	++++	+++	++	+
Patogenicidade (videiras)	+++	+	++	++++

A deleção dos genes *xadA* afeta marginalmente o perfil de expressão gênica global avaliado através de RNA-seq das cepas mutantes comparativamente a cepa selvagem, porém destaca-se, nas cepas mutantes, o aumento nos níveis dos transcritos de lipases/esterases que parecem atuar na degradação do tecido vegetal associado aos sintomas da doença de Pierce de videiras.

A deleção de *xadA3* resulta em um fenótipo de hipervirulência em videiras, mas também de deficiência de transmissão pelo inseto-vetor.

O conjunto dos resultados obtidos nesse trabalho evidenciam o importante papel desempenhado pelas adesinas XadAs, particularmente XadA3, nas adesão intercelular e no desenvolvimento do biofilme e na virulência de *X. fastidiosa*.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alencar, V. C., Barbosa, D., Santos, D. S., Oliveira, A. C., de Oliveira, R. C. & Nunes, L. R.** 2014. Genomic Sequencing of Two Coffee-Infecting Strains of *Xylella fastidiosa* Isolated from Brazil. *Genome Announc* 2.
2. **Allen, B. L., Gerlach, G. F. & Clegg, S.** 1991. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 173:916-20.
3. **Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S. & Purcell, A. H.** 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America* 98:775-786.
4. **Almeida, R. P. P., Nascimento, F. E., Chau, J., Prado, S. S., Tsai, C. W., Lopes, S. A. & Lopes, J. R. S.** 2008. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3690-3701.
5. **Almeida, R. P. P. & Nunney, L.** 2015. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? *Plant disease* 99:1457-1467.
6. **Almeida, R. P. P. & Purcell, A. H.** 2006. Patterns of *Xylella fastidiosa* colonization on the precibarium of sharpshooter vectors relative to transmission to plants. *Annals of the Entomological Society of America* 99:884-890.
7. **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10.
8. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-402.
9. **Alves, C. A., Pedroso, M. M., de Moraes, M. C., Souza, D. H. F., Cass, Q. B. & Faria, R. C.** 2011. Real-time investigation of mannosyltransferase function of a *Xylella fastidiosa* recombinant GumH protein using QCM-D. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408:571-575.
10. **Alves, E., Kitajima, E. W. & Leite, B.** 2003. Interaction of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum*: a comparison of colonization patterns. *Journal of Phytopathology* 151:500-506.
11. **Andrews, S., Lindenbaum, P., Howard, B. & Ewels, P.** 2014. FastQC High Throughput Sequence QC Report, 0.11.2 ed.
12. **Ausubel, F. F., M.** 1995. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
13. **Baccari, C., Killiny, N., Ionescu, M., Almeida, R. P. & Lindow, S.** 2014. Diffusible Signal Factor-Repressed Extracellular Traits Enable Attachment of *Xylella fastidiosa* to Insect Vectors and Transmission. *Phytopathology* 104:27-33.
14. **Batchelor, M., Knutton, S., Caprioli, A., Huter, V., Zanimal, M., Dougan, G. & Frankel, G.** 1999. Development of a Universal Intimin Antiserum and PCR Primers. *Journal of clinical microbiology*:3822–3827.
15. **Beaulieu, E. D., Ionescu, M., Chatterjee, S., Yokota, K., Trauner, D. & Lindow, S.** 2013. Characterization of a Diffusible Signaling Factor from *Xylella fastidiosa*. *mBio* 4:e00539-12.
16. **Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausboll, A. & Brunak, S.** 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *Bmc Microbiology* 5.

17. **Benz, I. & Schmidt, M. A.** 2011. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 301:461-468.
18. **Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G. & Brun, Y. V.** 2015. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiology Spectrum* 3.
19. **Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P. & Chapman, M. R.** 2012. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends in Microbiology* 20:66-73.
20. **Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emody, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V. F. & Uden, G.** 2005. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology* 151:3287-98.
21. **Boch, J., and Bonas, U.** 2001. Gram-negative plant pathogenic bacteria., p. 186-196 *In* I. S. Mühldorfer, K. P. (ed.), *In Emerging Bacterial Pathogens*, vol. 8. Pathogens. Contrib Microbiol., Basel, Karger.
22. **Bonnington, K. E. & Kuehn, M. J.** 2014. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et biophysica acta* 1843:1612-1619.
23. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
24. **Cao, B., Zhao, Y., Kou, Y., Ni, D., Zhang, X. C. & Huang, Y.** 2014. Structure of the nonameric bacterial amyloid secretion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:E5439-E5444.
25. **Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R. & Grutter, M. G.** 2006. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8:2284-90.
26. **Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., De Stradis, A., Loconsole, G., Nigro, F., Porcelli, F., Potere, O. & Martelli, G. P.** 2014. Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology* 96:425-429.
27. **Caserta, R., Takita, M. A., Targon, M. L., Rosselli-Murai, L. K., de Souza, A. P., Peroni, L., Stach-Machado, D. R., Andrade, A., Labate, C. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A. & de Souza, A. A.** 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 76:4250-4259.
28. **Chagnot, C., Zorgani, M. A., Astruc, T. & Desvaux, M.** 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in Microbiology* 4.
29. **Chang, C. J. & Donaldson, R. C.** 1993. *Xylella-Fastidiosa* - Cultivation in Chemically Defined Medium. *Phytopathology* 83:192-194.
30. **Chang, J. H., Desveaux, D. & Creason, A. L.** 2014. The ABCs and 123s of Bacterial Secretion Systems in Plant Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 52:317-345.
31. **Chatterjee, S., Almeida, R. P. & Lindow, S.** 2008a. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev Phytopathol* 46:243-71.

32. **Chatterjee, S., Almeida, R. P. P. & Lindow, S.** 2008b. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology* 46:243-271.
33. **Chatterjee, S., Killiny, N., Almeida, R. P. P. & Lindow, S. E.** 2010. Role of Cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* Biofilm Formation, Plant Virulence, and Insect Transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:1356-1363.
34. **Chatterjee, S., Newman, K. L. & Lindow, S. E.** 2008c. Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in grape. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:1309-1315.
35. **Chatterjee, S. N. & Das, J.** 1967. Electron Microscopic Observations on the Excretion of Cell-wall Material by *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 49:1-11.
36. **Chen, Y., Lun, A. T. & Smyth, G. K.** 2016. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Res* 5:1438.
37. **Clifford, J. C., Rapicavoli, J. N. & Roper, M. C.** 2013. A rhamnose-rich O-antigen mediates adhesion, virulence, and host colonization for the xylem-limited phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 26:676-85.
38. **Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X. G. & Mortazavi, A.** 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* 17.
39. **Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M. & Waksman, G.** 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology* 13:343.
40. **Cotter, S. E., Surana, N. K. & St Geme, J. W.** 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends in Microbiology* 13:199-205.
41. **da Silva, F. R., Vettore, A. L., Kemper, E. L., Leite, A. & Arruda, P.** 2001. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters* 203:165-171.
42. **da Silva, J. F., Koide, T., Gomes, S. L. & Marques, M. V.** 2007. The single "Extracytoplasmic-Function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism. *Journal of Bacteriology* 189:551-560.
43. **da Silva Neto, J. F., Koide, T., Abe, C. M., Gomes, S. L. & Marques, M. V.** 2008. Role of sigma54 in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. *Arch Microbiol* 189:249-61.
44. **Danhorn, T. & Fuqua, C.** 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61:401-422.
45. **Dautin, N. & Bernstein, H. D.** 2007. Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria via the Autotransporter Pathway. *Annual Review of Microbiology* 61:89-112.
46. **Davis, M., French, W. & Schaad, N.** 1981a. Axenic Culture Of The Bacteria Associated With Phony Disease Of Peach And Plum Leaf Scald. *Curr Microbiol* 6:309-314.
47. **Davis, M. J., French, W. J. & Schaad, N. W.** 1981b. AXENIC CULTURE OF THE BACTERIA ASSOCIATED WITH PHONY DISEASE OF PEACH AND PLUM LEAF SCALD. *Current Microbiology* 6:309-314.

48. **Davis, M. J., Purcell, A. H. & Thomson, S. V.** 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199:75-7.
49. **De La Fuente, L., Burr, T. J. & Hoch, H. C.** 2007a. Mutations in type I and type IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology* 189:7507-7510.
50. **De La Fuente, L., Montanes, E., Meng, Y., Li, Y., Burr, T. J., Hoch, H. C. & Wu, M.** 2007b. Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber. *Appl Environ Microbiol* 73:2690-6.
51. **De la Fuente, L., Montanes, E., Meng, Y. Z., Li, Y. X., Burr, T. J., Hoch, H. C. & Wu, M. M.** 2007c. Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2690-2696.
52. **De La Fuente, L., Parker, J. K., Oliver, J. E., Granger, S., Brannen, P. M., van Santen, E. & Cobine, P. A.** 2013. The bacterial pathogen *Xylella fastidiosa* affects the leaf ionome of plant hosts during infection. *Plos One* 8:e62945.
53. **de Pieri, C., Beltramini, L. M., Selistre-de-Araújo, H. S., Vettore, A. L., da Silva, F. R., Arruda, P., Oliva, G. & de Souza, D. H. F.** 2004. Overexpression, purification, and biochemical characterization of GumC, an enzyme involved in the biosynthesis of exopolysaccharide by *Xylella fastidiosa*. *Protein Expression and Purification* 34:223-228.
54. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta, H. D., Caldana, C., Goldman, G. H., Yanai, G. M., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R. & Machado, M. A.** 2003. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:867-875.
55. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta, H. D., Caldana, C., Yanai, G. M., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R. & Machado, M. A.** 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *Fems Microbiology Letters* 237:341-353.
56. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Pereira, E. O., Coletta, H. D. & Machado, M. A.** 2005. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Current Microbiology* 50:223-228.
57. **Desvaux, M., Cooper, L. M., Filenko, N. A., Scott-Tucker, A., Turner, S. M., Cole, J. A. & Henderson, I. R.** 2006. The unusual extended signal peptide region of the type V secretion system is phylogenetically restricted. *Fems Microbiology Letters* 264:22-30.
58. **Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B. & Darfeuille-Michaud, A.** 2003. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in microbiology* 154:9-16.
59. **Dunne, W. M., Jr.** 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews* 15:155-66.
60. **Edwards, T. E., Phan, I., Abendroth, J., Dieterich, S. H., Masoudi, A., Guo, W., Hewitt, S. N., Kelley, A., Leibly, D., Brittnacher, M. J., Staker, B. L., Miller, S. I., Van Voorhis, W. C., Myler, P. J. & Stewart, L. J.** 2010. Structure of a *Burkholderia pseudomallei* Trimeric Autotransporter Adhesin Head. *Plos One* 5.
61. **EFSA.** 2016. Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 20 November 2015. *EFSA Journal* 14:4378.

62. **Espert, S. M., Elsinghorst, E. A. & Munson, G. P.** 2011. The tib adherence locus of enterotoxigenic *Escherichia coli* is regulated by cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 193:1369-76.
63. **Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D. B. R. K. G., Leo, J. C. & Linke, D.** 2016. Type V Secretion Systems in Bacteria. *Microbiology Spectrum* 4.
64. **Feil, H., Feil, W. S. & Lindow, S. E.** 2007. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology* 97:318-324.
65. **Feitosa-Junior, O. R.** 2017. Caracterização do secretoma de cepas de *Xylella fastidiosa*. *Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo*. 146.
66. **Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H.-R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. L. & Bateman, A.** 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 36:D281-D288.
67. **Flemming, H.-C. & Wingender, J.** 2010a. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623.
68. **Flemming, H. C. & Wingender, J.** 2010b. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633.
69. **Fogaca, A. C., Zaini, P. A., Wulff, N. A., da Silva, P. I. P., Fazio, M. A., Miranda, A., Daffre, S. & da Silva, A. M.** 2010. Effects of the antimicrobial peptide gomesin on the global gene expression profile, virulence and biofilm formation of *Xylella fastidiosa*. *Fems Microbiology Letters* 306:152-159.
70. **Francis, M., Civerolo, E. L. & Bruening, G.** 2008. Improved Bioassay of *Xylella fastidiosa* using *Nicotiana tabacum* cultivar SR1. *Plant Disease* 92:14-20.
71. **Fuqua, C. & Danhorn, T.** 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61:401-422.
72. **Galvani, C. D., Li, Y. X., Burr, T. J. & Hoch, H. C.** 2007. Twitching motility among pathogenic *Xylella fastidiosa* isolates and the influence of bovine serum albumin on twitching-dependent colony fringe morphology. *Fems Microbiology Letters* 268:202-208.
73. **Gambetta, G. A., Fei, J., Rost, T. L. & Matthews, M. A.** 2007. Leaf scorch symptoms are not correlated with bacterial populations during Pierce's disease. *Journal of Experimental Botany* 58:4037-4046.
74. **Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. & Bairoch, A.** 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31:3784-3788.
75. **Green, E. R. & Meccas, J.** 2016. Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiology spectrum* 4:10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
76. **Grin, I., Hartmann, M. D., Sauer, G., Hernandez Alvarez, B., Schutz, M., Madlung, J., Macek, B., Felipe-Lopez, A., Hensel, M., Lupas, A. & Linke, D.** 2013. A Trimeric Lipoprotein assists in Trimeric Autotransporter Biogenesis in Enterobacteria. *J Biol Chem*.
77. **Grin, I., Hartmann, M. D., Sauer, G., Hernandez Alvarez, B., Schütz, M., Wagner, S., Madlung, J., Macek, B., Felipe-Lopez, A., Hensel, M., Lupas, A. & Linke, D.** 2014. A Trimeric Lipoprotein Assists in Trimeric Autotransporter Biogenesis in Enterobacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 289:7388-7398.
78. **Guérin, J., Bigot, S., Schneider, R., Buchanan, S. K. & Jacob-Dubuisson, F.** 2017. Two-Partner Secretion: Combining Efficiency and Simplicity in the

- Secretion of Large Proteins for Bacteria-Host and Bacteria-Bacteria Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:148.
79. **Guilhabert, M. R. & Kirkpatrick, B. C.** 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to X-fastidiosa biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:856-868.
  80. **Han, S. W., Lee, S. W. & Ronald, P. C.** 2011. Secretion, modification, and regulation of Ax21. *Current Opinion in Microbiology* 14:62-67.
  81. **Harlow, E. L., D.** 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
  82. **Heiniger, R. W., Winther-Larsen, H. C., Pickles, R. J., Koomey, M. & Wolfgang, M. C.** 2010. Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cellular microbiology* 12:1158-73.
  83. **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D.** 2004. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:692-744.
  84. **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in Microbiology* 6:370-378.
  85. **Hill, B. L. & Purcell, A. H.** 1995. Acquisition and Retention of *Xylella-Fastidiosa* by an Efficient Vector, *Graphocephala-Atropunctata*. *Phytopathology* 85:209-212.
  86. **Hopkins, D. L.** 1989. *Xylella-Fastidiosa* - Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. *Annual Review of Phytopathology* 27:271-290.
  87. **Hopkins, D. L. & Purcell, A. H.** 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease* 86:1056-1066.
  88. **Ionescu, M., Baccari, C., Da Silva, A. M., Garcia, A., Yokota, K. & Lindow, S. E.** 2013. Diffusible Signal Factor (DSF) Synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* Is a Multifunction Protein Also Required for Response to DSF. *Journal of Bacteriology* 195:5273-5284.
  89. **Ionescu, M., Zaini, P. A., Baccari, C., Tran, S., da Silva, A. M. & Lindow, S. E.** 2014a. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:E3910-E3918.
  90. **Ionescu, M., Zaini, P. A., Baccari, C., Tran, S., da Silva, A. M. & Lindow, S. E.** 2014b. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *PNAS* 111 E3910-E3918.
  91. **Jacques, M.-A., Denancé, N., Legendre, B., Morel, E., Briand, M., Mississipi, S., Durand, K., Olivier, V., Portier, P., Poliakov, F. & Crouzillat, D.** 2016. New coffee plant-infecting *Xylella fastidiosa* variants derived via homologous recombination. *Appl Environ Microbiol* 82:1556-1568.
  92. **Jagnow, J. & Clegg, S.** 2003. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* 149:2397-405.
  93. **Janse, J. D. & Obradovic, A.** 2010. *Xylella Fastidiosa*: Its Biology, Diagnosis, Control and Risks. *Journal of Plant Pathology* 92:S35-S48.
  94. **Jefferson, K. K.** 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236:163-173.

95. **Jones, J. D. & Dangl, J. L.** 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-9.
96. **Julio, S. M. & Cotter, P. A.** 2005. Characterization of the filamentous hemagglutinin-like protein FhaS in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 73:4960-71.
97. **Kajava, A. V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M. N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Steven, A. C.** 2001. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Molecular Microbiology* 42:279-92.
98. **Kay, S. & Bonas, U.** 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12:37-43.
99. **Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J.** 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845-58.
100. **Killiny, N. & Almeida, R.** 2008. Role of fimbrial and afimbrial adhesins and gum production on *Xylella fastidiosa* insect transmission. *Phytopathology* 98:S81-S81.
101. **Killiny, N. & Almeida, R. P.** 2009a. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Appl Environ Microbiol* 75:521-8.
102. **Killiny, N. & Almeida, R. P.** 2014. Factors affecting the initial adhesion and retention of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* in the foregut of an insect vector. *Appl Environ Microbiol* 80:420-6.
103. **Killiny, N. & Almeida, R. P. P.** 2009b. *Xylella fastidiosa* Afimbrial Adhesins Mediate Cell Transmission to Plants by Leafhopper Vectors. *Applied and Environmental Microbiology* 75:521-528.
104. **Killiny, N., Prado, S. S. & Almeida, R. P. P.** 2010. Chitin Utilization by the Insect-Transmitted Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6134-6140.
105. **Kirkpatrick, B. & Guilhabert, M.** 2005. *Xylella fastidiosa* (Xf) anti-virulence genes: Hemagglutinins contribute to Xf biofilm maturation and colonization. *Phytopathology* 95:S54-S54.
106. **Koebnik, R., Mhedbi-Hajri, N. & Jacques, M. A.** 2011. Adhesion Mechanisms of Plant-Pathogenic Xanthomonadaceae. *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics* 715:71-89.
107. **Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z. & Hasnain, S. E.** 2017. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 307:481-489.
108. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
109. **Lehr, U. S., M.; Oberhettinger, P.; Ruiz-Perez, F.; Donald, J. W.; Palmer, T.; Linke, D.; Henderson, I. R.; Autenrieth, I. B.** 2010. C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA. *Molecular Microbiology* 78:932-946.
110. **Leo, J. C., Grin, I. & Linke, D.** 2012. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367:1088-1101.
111. **Lerat, E., Daubin, V., Ochman, H. & Moran, N. A.** 2005. Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *PLoS Biol* 3:e130.

112. **Li, N. Z., Y.; LaFrenz, B. R.; Evenhuis, J. P.; Hunnicutt, D. W.; Conrad, R. A.; Barbier, P.; Gullstrand, C. W.; Roets, J.E.; Powers, J. L.; Kulkarni, S. S.; Erbes, D. H.; García, J. C.; Nie, P.; McBride, M. J.** 2017. The Type IX Secretion System Is Required for Virulence of the Fish Pathogen *Flavobacterium columnare*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e01769-17.
113. **Li, W. B., Zreik, L., Fernandes, N. G., Miranda, V. S., Teixeira, D. C., Ayres, A. J., Garnier, M. & Bov, J. M.** 1999. A triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Curr Microbiol* 39:106-8.
114. **Li, Y., Hao, G., Galvani, C. D., Meng, Y., De La Fuente, L., Hoch, H. C. & Burr, T. J.** 2007a. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* 153:719-26.
115. **Li, Y. X., Hao, G. X., Galvani, C. D., Meng, Y. Z., De la Fuente, L., Hoch, H. C. & Burr, T. J.** 2007b. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology-Sgm* 153:719-726.
116. **Lin, H., Doddapaneni, H., Takahashi, Y. & Walker, M. A.** 2007. Comparative analysis of ESTs involved in grape responses to *Xylella fastidiosa* infection. *Bmc Plant Biology* 7:-.
117. **Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I. B., Lupas, A. & Kempf, V. A. J.** 2006. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends in Microbiology* 14:264-270.
118. **Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.
119. **Lorite, G. S., Janissen, R., Clerici, J. H., Rodrigues, C. M., Tomaz, J. P., Mizaikoff, B., Kranz, C., de Souza, A. A. & Cotta, M. A.** 2013. Surface physicochemical properties at the micro and nano length scales: role on bacterial adhesion and *Xylella fastidiosa* biofilm development. *Plos One* 8:e75247.
120. **Love, M. I., Huber, W. & Anders, S.** 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
121. **Lyskowski, A., Leo, J. C. & Goldman, A.** 2011. Structure and Biology of Trimeric Autotransporter Adhesins, p. 143-158. *In* D. Linke & A. Goldman (ed.), *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics*, vol. 715.
122. **Markowitz, V. M., Chen, I. M. A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J. H., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N. N. & Kyrpides, N. C.** 2012. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Research* 40:D115-D122.
123. **Matsumoto, A., Huston, S. L., Killiny, N. & Igo, M. M.** 2012. XatA, an AT-1 autotransporter important for the virulence of *Xylella fastidiosa* Temecula1. *MicrobiologyOpen* 1:33-45.
124. **Mattick, J. S.** 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology* 56:289-314.
125. **Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J. & Hoch, H. C.** 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol* 187:5560-7.
126. **Mol, O. & Oudega, B.** 1996. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 19:25-52.

127. **Monteiro, P. B., Teixeira, D. C., Palma, R. R., Garnier, M., Bové, J.-M. & Renaudin, J.** 2001. Stable Transformation of the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis Strain with oriC Plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2263-2269.
128. **Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B.** 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5:621-8.
129. **Nascimento, R., Gouran, H., Chakraborty, S., Gillespie, H. W., Almeida-Souza, H. O., Tu, A., Rao, B. J., Feldstein, P. A., Bruening, G., Goulart, L. R. & Dandekar, A. M.** 2016. The Type II Secreted Lipase/Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. *Scientific Reports* 6:18598.
130. **Newman, K. L., Almeida, R. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E.** 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl Environ Microbiol* 69:7319-27.
131. **Newman, K. L., Almeida, R. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E.** 2004a. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1737-42.
132. **Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E.** 2004b. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1737-1742.
133. **Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M. & Goldman, A.** 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *Embo Journal* 23:701-711.
134. **Nunney, L., Schuenzel, E. L., Scally, M., Bromley, R. E. & Stouthamer, R.** 2014. Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Appl Environ Microbiol* 80:3025-33.
135. **Orans, J., Johnson, M. D., Coggan, K. A., Sperlazza, J. R., Heiniger, R. W., Wolfgang, M. C. & Redinbo, M. R.** 2010. Crystal structure analysis reveals *Pseudomonas* PilY1 as an essential calcium-dependent regulator of bacterial surface motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:1065-70.
136. **Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B. & Peek, A. S.** 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research* 36:W163-W169.
137. **Park, E., Williams, B., Wold, B. J. & Mortazavi, A.** 2012. RNA editing in the human ENCODE RNA-seq data. *Genome Res* 22:1626-33.
138. **Pashalidis, S., Moreira, L. M., Zaini, P. A., Campanharo, J. C., Alves, L. M., Ciapina, L. P., Vencio, R. Z., Lemos, E. G., Da Silva, A. M. & Da Silva, A. C.** 2005. Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. *Omics* 9:77-90.
139. **Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8:785-786.

140. **Pierry, P. M.** 2012. Pirosequenciamento e análise comparativa de genomas do fitopatógeno *Xylella fastidiosa*. Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
141. **Pierry, P. M.** 2017. Transcritômica comparativa de cepas de *Xylella fastidiosa*. Bioquímica, Pierry, Paulo Marques São Paulo. 196.
142. **Pooler, M. R. & Hartung, J. S.** 1995. Specific Pcr Detection and Identification of *Xylella-Fastidiosa* Strains Causing Citrus Variegated Chlorosis. *Current Microbiology* 31:377-381.
143. **Preston, G. M., Studholme, D. J. & Caldelari, I.** 2005. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *Fems Microbiology Reviews* 29:331-360.
144. **Purcell, A. H. & Hopkins, D. L.** 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34:131-151.
145. **Purcell, A. H. & Saunders, S. R.** 1999. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. *Plant Disease* 83:825-830.
146. **Purcell, A. H., Saunders, S. R., Hendson, M., Grebus, M. E. & Henry, M. J.** 1999. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Phytopathology* 89:53-58.
147. **Purcino, R. P., Medina, C. L., Martins, D., Winck, F. V., Machado, E. C., Novello, J. C., Machado, M. A. & Mazzafera, P.** 2007. *Xylella fastidiosa* disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange *Citrus sinensis* cv. Pera. *Journal of Experimental Botany* 58:2733-2744.
148. **R Core Team.** 2013. R: A Language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
149. **Randall, J. J., Goldberg, N. P., Kemp, J. D., Radionenko, M., French, J. M., Olsen, M. W. & Hanson, S. F.** 2009. Genetic Analysis of a Novel *Xylella fastidiosa* Subspecies Found in the Southwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology* 75:5631-5638.
150. **Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R., Blua, M. J., Mizell, R. F., 3rd & Andersen, P. C.** 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu Rev Entomol* 49:243-70.
151. **Rodrigues, C. M., de Souza, A. A., Takita, M. A., Kishi, L. T. & Machado, M. A.** 2013. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *Bmc Genomics* 14.
152. **Rojas, C. M., Ham, J. H., Deng, W. L., Doyle, J. J. & Collmer, A.** 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13142-13147.
153. **Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. A. & Kirkpatrick, B. C.** 2007a. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7252-7258.
154. **Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. M. & Kirkpatrick, B. C.** 2007b. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Appl Environ Microbiol* 73:7252-8.

155. **Rossetti, V., Garnier, M., Bove, J. M., Beretta, M. J. G., Teixeira, A. R. R., Quaggio, J. A. & Denegri, J. D.** 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* 310:345-349.
156. **Rozen, S. & Skaletsky, H.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-86.
157. **Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D. & Dow, J. M.** 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7:514-25.
158. **SAMBROOK, J. F., E.F.; MANIATIS, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. , 2 ed, Ney York.
159. **Santana, W. O. d.** 2013. *Genômica comparativa de Xylella fastidiosa: diversidade do pangenoma e análise de genes de patogenicidade*. Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 152.
160. **Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F. & Martelli, G. P.** 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). *Journal of Plant Pathology* 95:668.
161. **Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M. & Chang, C. J.** 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. (vol 27, pg 290, 2004). *Systematic and Applied Microbiology* 27:763-763.
162. **Schmieder, R., Lim, Y. W. & Edwards, R.** 2012. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics* 28:433-5.
163. **Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. & Ragg, T.** 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7:3-3.
164. **Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A. & Struve, C.** 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol* 10:179.
165. **Schuenzel, E. L., Scally, M., Stouthamer, R. & Nunney, L.** 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3832-3839.
166. **Schurch, N. J., Schofield, P., Gierlinski, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G. G., Owen-Hughes, T., Blaxter, M. & Barton, G. J.** 2016. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *Rna* 22:839-851.
167. **Sebghati, T. A. & Clegg, S.** 1999. Construction and characterization of mutations within the *Klebsiella mrkD1P* gene that affect binding to collagen type V. *Infect Immun* 67:1672-6.
168. **Shi, X. Y., Dumenyo, C. K., Hernandez-Martinez, R., Azad, H. & Cooksey, D. A.** 2009. Characterization of Regulatory Pathways in *Xylella fastidiosa*: Genes and Phenotypes Controlled by *gacA*. *Applied and Environmental Microbiology* 75:2275-2283.

169. **Sikdar, R., Peterson, J. H., Anderson, D. E. & Bernstein, H. D.** 2017. Folding of a bacterial integral outer membrane protein is initiated in the periplasm. *Nature Communications* 8:1309.
170. **Silva-Stenico, M. E., Pacheco, F. T. H., Pereira, E. R., Rodrigues, J. L. M., Souza, A. N., Etcheagaray, A., Gomes, J. E. & Tsai, S. M.** 2009. Nutritional deficiency in citrus with symptoms of citrus variegated chlorosis disease. *Brazilian Journal of Biology* 69:859-864.
171. **Smolka, M. B., Martins, D., Winck, F. V., Santoro, C. E., Castellari, R. R., Ferrari, F., Brum, I. J., Galembeck, E., Coletta, H. D., Machado, M. A., Marangoni, S. & Novello, J. C.** 2003. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* 3:224-237.
172. **Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N. S., Alegria, M. C., Barbosa, L. R. S., Salinas, R. K., Guzzo, C. R. & Farah, C. S.** 2015. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature Communications* 6:6453.
173. **Strona, G., Carstens, C. J. & Beck, P. S.** 2017. Network analysis reveals why *Xylella fastidiosa* will persist in Europe. *Sci Rep* 7:71.
174. **Sun, Q. A., Greve, L. C. & Labavitch, J. M.** 2011. Polysaccharide Compositions of Intervessel Pit Membranes Contribute to Pierce's Disease Resistance of Grapevines. *Plant Physiology* 155:1976-1987.
175. **Szczesny, P., Linke, D., Ursinus, A., Baer, K., Schwarz, H., Riess, T. M., Kempf, V. A. J., Lupas, A. N., Martin, J. & Zeth, K.** 2008. Structure of the head of the Bartonella adhesin BadA. *Plos Pathogens* 4.
176. **Tarkkanen, A. M., Virkola, R., Clegg, S. & Korhonen, T. K.** 1997. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect Immun* 65:1546-9.
177. **Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.** 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-82.
178. **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
179. **Tseng, T.-T., Tyler, B. M. & Setubal, J. C.** 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology* 9:S2-S2.
180. **Tuson, H. H. & Weibel, D. B.** 2013. Bacteria-surface interactions. *Soft matter* 9:4368-4380.
181. **Van Sluys, M. A., de Oliveira, M. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Miyaki, C. Y., Furlan, L. R. et al.** 2003. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* 185:1018-26.
182. **Voegel, T. M., Warren, J. G., Matsumoto, A., Igo, M. M. & Kirkpatrick, B. C.** 2010. Localization and characterization of *Xylella fastidiosa* haemagglutinin adhesins. *Microbiology-Sgm* 156:2172-2179.
183. **Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelcopaul, L. & Brenner, D. J.** 1987. *Xylella-Fastidiosa* Gen-Nov, Sp-Nov - Gram-Negative,

- Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas*-Spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:136-143.
184. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-71.
  185. **Xia, Y. N. & Whitesides, G. M.** 1998. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science* 28:153-184.
  186. **Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S. C., Ester, M., Foster, L. J. & Brinkman, F. S. L.** 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26:1608-1615.
  187. **Zaini, P. A., Burdman, S., Igo, M. M., Parker, J. K. & De La Fuente, L.** 2016. CHAPTER 5: Fimbrial and Afimbrial Adhesins Involved in Bacterial Attachment to Surfaces, p. 73-106. *In* F. Leonardo De La, M. I. Michele, K. P. Jennifer, B. Saul & A. Z. Paulo (ed.), *Virulence Mechanisms of Plant-Pathogenic Bacteria*. The American Phytopathological Society.
  188. **Zaini, P. A., De La Fuente, L., Hoch, H. C. & Burr, T. J.** 2009. Grapevine xylem sap enhances biofilm development by *Xylella fastidiosa*. *Fems Microbiology Letters* 295:129-134.
  189. **Zaini, P. A., Fogaca, A. C., Lupo, F. G. N., Nakaya, H. I., Vencio, R. Z. N. & da Silva, A. M.** 2008. The iron stimulon of *Xylella fastidiosa* includes genes for type IV pilus and colicin V-like bacteriocins. *Journal of Bacteriology* 190:2368-2378.

## 7 APÊNDICE

### 7.1 Alinhamento múltiplo das sequências de XadA3 de cepas de *X. fastidiosa*

O alinhamento abaixo foi realizado com o programa CLUSTAL O (1.2.4) com as sequências de aminoácidos de XadA3 das cepas listadas na tabela 10 exceto da cepa PLS229 que aparentemente está incompleta.

```

9a5c          MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
J1a12        MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
U24d         MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
Fb7          MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
3124         MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
Hib4         MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
Pr8x         MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
XRB          MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
B111         MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
Temecula1   MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGRSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
M12          MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRCSNNAMTAKR 60
M23          MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGRSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
GB514       MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGRSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
Ann-1       MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGRSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
Dixon       MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRCSNNAMTAKR 60
Mul-MD      MQIHTALPMVRWGGIEGVDPLFLPKYKIGRSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
Mullberry   MQIHTALPMVRWGGIEGVDPLFLPKYKIGRSLQHAVMTSAASSKKGTQPRRSNNAMTAKR 60
ATCC35871   MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRCSNNAMTAKR 60
Griffin-1   MQIHTALPMVRLGGIEGVDPLFLPKYKIGQSLQHAVMTSAASSKKGTQPRCSNNAMTAKR 60
*****
9a5c          SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
J1a12        SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
U24d         SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Fb7          SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
3124         SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Hib4         SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Pr8x         SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
XRB          SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
B111         SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Temecula1   SAKPHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
M12          SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
M23          SAKPHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
GB514       SAKPHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Ann-1       SAKPHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Dixon       SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Mul-MD      SAKPHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Mullberry   SAKPHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
ATCC35871   SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
Griffin-1   SAKLHRRQLHIVLLTVLAASTGYTGKVAQVYVNSDSTENCVEILGDSSQTSFIHSASN 120
***

```

9a5c DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 J1a12 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 U24d DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Fb7 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 3124 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Hib4 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Pr8x DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 XRB DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 B111 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Temecula1 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 M12 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 M23 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 GB514 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Ann-1 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Dixon DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Mul-MD DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Mullberry DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 ATCC35871 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 Griffin-1 DKCKPDMFTQTEYSLFYDYRNLVLGGSLYVNEGKLGGLVDISGATYSMRLGSIATMNGSAGI 180  
 \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

9a5c DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 J1a12 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 U24d DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Fb7 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 3124 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Hib4 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Pr8x DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 XRB DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 B111 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Temecula1 DSIAGSGQGSQTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 M12 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDTISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 M23 DSIAGSGQGSQTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 GB514 DSIAGSGQGSQTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Ann-1 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Dixon DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDTISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Mul-MD DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Mullberry DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDAISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 ATCC35871 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDTISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 Griffin-1 DSIAGSGQGSKTDGNTSGATVAQGLRSIAIGTTARSQSQDTISIGTGASTTGNFAIAIG 240  
 \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

9a5c NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 J1a12 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 U24d NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 Fb7 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 3124 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 Hib4 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 Pr8x NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 XRB NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 B111 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 Temecula1 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 M12 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 M23 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSIWRST 300  
 GB514 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSIWRST 300  
 Ann-1 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKTTSTLSTSMWRST 300  
 Dixon NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 Mul-MD NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKTTSTLSTSIWRST 300  
 Mullberry NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKTTSTLSTSIWRST 300  
 ATCC35871 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 Griffin-1 NGALTSIANGIALGASSSVTTTRGGVALGQGS LAATASGITGYDPVTKSTSTLSTSMWRST 300  
 \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

9a5c	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
J1a12	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
U24d	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Fb7	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
3124	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Hib4	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Pr8x	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
XR8	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
B111	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Temecula1	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
M12	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
M23	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
GB514	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Ann-1	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Dixon	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Mul-MD	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Mullberry	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
ATCC35871	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
Griffin-1	LGAVSIGNITSSTSQTRQLTGLAAGRSDDAVNVAQLKLLAESVGGGWNLASGANSNNV	360
	*****	
9a5c	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
J1a12	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
U24d	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
Fb7	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
3124	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
Hib4	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
Pr8x	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
XR8	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
B111	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
Temecula1	ALGESVDLKNSDGNLLITKATDSNDVTFNLATALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGKRVTLD	420
M12	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
M23	ALGESVDLKNSDGNLLITKATDSNDVTFNLATALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGKRVTLD	420
GB514	ALGESVDLKNSDGNLLITKATDSNDVTFNLATALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGKRVTLD	420
Ann-1	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
Dixon	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
Mul-MD	ALGESVDLKNSDGNLLITKATDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMT-----	407
Mullberry	ALGESVDLKNSDGNLLITKATDSNDVTFNLATALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGKRVTLD	420
ATCC35871	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
Griffin-1	ALGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLAT-----	392
	*****:*****	
9a5c	-----	392
J1a12	-----	392
U24d	-----	392
Fb7	-----	392
3124	-----	392
Hib4	-----	392
Pr8x	-----	392
XR8	-----	392
B111	-----	392
Temecula1	STGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIINVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNLLASGA	480
M12	-----	392
M23	STGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIINVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNLLASGA	480
GB514	STGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIINVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNLLASGA	480
Ann-1	-----	392
Dixon	-----	392
Mul-MD	-----	407
Mullberry	STGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIINVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNLLASGT	480
ATCC35871	-----	392
Griffin-1	-----	392

9a5c	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
J1a12	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
U24d	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
Fb7	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
3124	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
Hib4	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
Pr8x	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
XRB	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
B111	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK	415
Temecula1	NSSNVAPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS			540
M12	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS	415
M23	NSSNVAPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS			540
GB514	NSSNVAPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS			540
Ann-1	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS	415
Dixon	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS	415
Mul-MD	-----	-----		407
Mullberry	NSSNVAPGASVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDGVTVGK			540
ATCC35871	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS	415
Griffin-1	-----	-----	ALKVDSLTTGNTAMTTDGVAVGS	415

9a5c		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
J1a12		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
U24d		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
Fb7		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
3124		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
Hib4		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIINVGTGTADTDAVNFSQLQAVSDTASKGWNL		475
Pr8x		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
XRB		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
B111		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		475
Temecula1		NVKLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFSQLQAVSSTASKGWNL		600
M12		NVKLGSTGLIITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFSQLQAVSSTASKGWNL		475
M23		NVKLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFSQLQAVSSTASKGWNL		600
GB514		NVKLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFSQLQAVSSTASKGWNL		600
Ann-1		NVKLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVTAGTADTDAVNFSQLQAVSSTASKGWNL		475
Dixon		NVKLGSTGLIITDGPSVTSSGIS-----		438
Mul-MD		-----		407
Mullberry		RVTLDSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIINVGTGTADTDAVNFGQLQAVSDTASKGWNL		600
ATCC35871		NVKLGS-----		421
Griffin-1		NVKLGS-----		421

9a5c		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
J1a12		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
U24d		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
Fb7		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
3124		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
Hib4		AASGANSSN-----		484	
Pr8x		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
XRB		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
B111		LASGTNSSNVAPGASVDLKNKTDGNLLITKAIGINDVTFNLATALEADSLTTGNTAMTTDG		535	
Temecula1		LASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDG		660	
M12		LASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDG		535	
M23		LASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDG		660	
GB514		LASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDG		660	
Ann-1		LASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLTTGNTAMTTDG		660	
Dixon		-----		528	
Mul-MD		-----		438	
Mul-MD		-----		TDG	410
Mullberry		LASGTNSSNVAPGGSVDLKNKTDGNIVISKEGSDVLFNLSSSLKLDKLTVGDTVMTTNG		660	
ATCC35871		-----		421	
Griffin-1		-----		421	

9a5c	VT-----	537
J1a12	VT-----	537
U24d	VT-----	537
Fb7	VT-----	537
3124	VT-----	537
Hib4	-----	484
Pr8x	VT-----	537
XRB	VT-----	537
B111	VT-----	537
Temecula1	VAVGSNVKLGSTGLVITDGPSVT-----	683
M12	VT-----	537
M23	VAVGSNVKLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVVNFSQLQAVSSTAS	720
GB514	VAVGSNVKLGSTGLVITDGPSVT-----	683
Ann-1	-----	528
Dixon	-----	438
Mul-MD	VAVGSNVKLGSTGLVITDGPSVT-----	433
Mullberry	VAVGSNVKLGSTGLVITDGPSVT-----	683
ATCC35871	-----	421
Griffin-1	-----	421

9a5c	-----	537
J1a12	-----	537
U24d	-----	537
Fb7	-----	537
3124	-----	537
Hib4	-----	484
Pr8x	-----	537
XRB	-----	537
B111	-----	537
Temecula1	-----	683
M12	-----	537
M23	KGWNLLASGANSSNVAPGGSDVLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDLSLTTGNTA	780
GB514	-----	683
Ann-1	-----TA	530
Dixon	-----	438
Mul-MD	-----	433
Mullberry	-----	683
ATCC35871	-----	421
Griffin-1	-----	421

9a5c	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	590
J1a12	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQK-----	568
U24d	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	590
Fb7	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	590
3124	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	590
Hib4	-----	484
Pr8x	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	590
XRB	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	590
B111	-----VGSNVTLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	590
Temecula1	-----SSGISAGNQKITNVAAGTADTDVVNFSQLQAV	715
M12	-----VGKRVTL DSTGLVIAEGPSVISSGINAAGQKIMNVGTGTADTDVNFSQLQAV	590
M23	MTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDVVNFSQLQAV	840
GB514	-----SSGISAGNQKITNVAAGTADTDVVNFSQLQAV	715
Ann-1	MTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSVTSSGISAGNQKITNVTAGTADTDVNFSQLQAV	590
Dixon	-----	438
Mul-MD	-----SSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	465
Mullberry	-----SSGISAGNQKITNVAAGTADTDVNFSQLQAV	715
ATCC35871	-----	421
Griffin-1	-----	421

9a5c	SSTASKGWNLLASGANSSNVVPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
J1a12	-----	568
U24d	SSTASKGWNLLASGANSSNVVPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
Fb7	SSTASKGWNLLASGANSSNVVPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
3124	SSTASKGWNLLASGANSSNVVPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
Hib4	-----VALGESVDLKNSDGNLLITKTTGSNDVTFNLATALKVDLSLT	525
Pr8x	SSTASKGWNLLASGANSSNVVPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
XRb	SSTASKGWNLLASGANSSNVVPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
B111	SSTASKGWNLLASGANSSNVVPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
Temecula1	SSTASKGWNLLASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLT	775
M12	SDTASKGWNLLASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
M23	SSTASKGWNLLASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLT	900
GB514	SSTASKGWNLLASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLT	775
Ann-1	SSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALKVDLSLT	650
Dixon	-----	438
Mul-MD	SSTASKGWNLLASGANSSNVAPGGSVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLT	525
Mullberry	SSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNSDGNLLITKTTDSNDVTFNLATALEVDSLT	775
ATCC35871	-----	421
Griffin-1	-----	421
9a5c	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
J1a12	-----ITNVAAGTADTDAVNFS	585
U24d	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
Fb7	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
3124	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
Hib4	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	585
Pr8x	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
XRb	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
B111	TGNTAMTTDGVTVGSNVTLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
Temecula1	TGNTAMTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	835
M12	TGNTAMTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
M23	TGNTAMTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	960
GB514	TGNTAMTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	835
Ann-1	TGNTAMTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	710
Dixon	-----AGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	460
Mul-MD	TGNTAMTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	585
Mullberry	TGNTAMTTDGVAVGSNVKLGSTGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	835
ATCC35871	-----TGLVITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	460
Griffin-1	-----TGLIITDGPSTSSGISAGNQKITNVAAGTADTDAVNFS	460
*****		
9a5c	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
J1a12	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	645
U24d	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
Fb7	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
3124	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
Hib4	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	645
Pr8x	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
XRb	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
B111	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
Temecula1	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	895
M12	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
M23	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	1020
GB514	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	895
Ann-1	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	770
Dixon	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	520
Mul-MD	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	645
Mullberry	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	895
ATCC35871	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	520
Griffin-1	QLQAVSSTASKGWNLLASGANSSNVAPGESVDLKNKTDGNIVISKESGSDVLFNLSSSLK	520
*****		

```

9a5c          LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
J1a12        LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 705
U24d         LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
Fb7          LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
3124        LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
Hib4         LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 705
Pr8x         LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
XRB          LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
B111         LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
Temecula1   LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 955
M12          LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
M23          LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 1080
GB514        LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 955
Ann-1        LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 830
Dixon        LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 580
Mul-MD       LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 705
Mullberry   LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 955
ATCC35871   LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 580
Griffin-1   LDKLTVGDTVMTTNGVTVGSGVTLGSMGLVITDGPSTSSGINAGSQKITNVAAGTADTD 580
*****

9a5c          AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 890
J1a12        AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 765
U24d         AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 890
Fb7          AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 890
3124        AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 890
Hib4         AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 765
Pr8x         AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 890
XRB          AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 890
B111         AVNLSQLNTAMAGSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTRSIAVGVGTLASAEGATA 890
Temecula1   AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTGSIAGVGTLASAEGATA 1015
M12          AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGNGSIAVGVGTLASAEGATA 890
M23          AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTGSIAGVGTLASAEGATA 1140
GB514        AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTGSIAGVGTLASAEGATA 1015
Ann-1        AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTGSIAGVGTLASAEGATA 890
Dixon        AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGNGSIAVGVGTLASAEGATA 640
Mul-MD       AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTGSIAGVGTLASAEGATA 765
Mullberry   AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGTGSIAGVGTLASAEGATA 1015
ATCC35871   AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGNGSIAVGVGTLASAEGATA 640
Griffin-1   AVNLSQLNTAMASSGAKSVHYYSTYDGGTQGGNYNGDGATGNGSIAVGVGTLASAEGATA 640
*****

9a5c          VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 950
J1a12        VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 825
U24d         VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 950
Fb7          VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 950
3124        VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 950
Hib4         VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 825
Pr8x         VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 950
XRB          VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 950
B111         VSGGAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGLQNNTVGTVSV 950
Temecula1   IGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 1075
M12          MGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 950
M23          IGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 1200
GB514        IGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 1075
Ann-1        MGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 950
Dixon        MGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 700
Mul-MD       MGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 825
Mullberry   MGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 1075
ATCC35871   MGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 700
Griffin-1   MGSAAAASGKGSTAIGRNAVASADGSVALGDGAKDGARGAESYTGKYSGVQNNNTVGTVSV 700
:*****:*****

```

9a5c	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	1010
J1a12	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	885
U24d	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	1010
Fb7	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	1010
3124	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	1010
Hib4	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	885
Pr8x	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	1010
XRb	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	1010
B111	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDRVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSLN	1010
Temecula1	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	1135
M12	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	1010
M23	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	1260
GB514	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	1135
Ann-1	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIEILSEGQTFVKVNSVN	1010
Dixon	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVXXXXXXXXXAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	760
Mul-MD	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	885
Mullberry	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	1135
ATCC35871	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	760
Griffin-1	GDASKGETRTVSNVADAKEATDAVNLRQLDQVAQDANRYVDNKIESLSEGQTFVKVNSVN	760
	*****.***** ***** *****:	
9a5c	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
J1a12	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	945
U24d	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
Fb7	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
3124	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
Hib4	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	945
Pr8x	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
XRb	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
B111	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
Temecula1	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1195
M12	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
M23	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1320
GB514	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1195
Ann-1	NSATPIAAGVNATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1070
Dixon	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	820
Mul-MD	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	945
Mullberry	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	1195
ATCC35871	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	820
Griffin-1	NSATPIAAGVDATAIGVGATASGADSIAMGNKASASADNAVAIGNHSVADRANTVSVGSA	820
	*****:*****	
9a5c	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
J1a12	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1005
U24d	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
Fb7	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
3124	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
Hib4	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1005
Pr8x	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
XRb	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
B111	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
Temecula1	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1255
M12	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
M23	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1380
GB514	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1255
Ann-1	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1130
Dixon	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	880
Mul-MD	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1005
Mullberry	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	1255
ATCC35871	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	880
Griffin-1	GSERQVTNVAAGTADTDAVNVSQNLQGLITAKQYTDGVVGSRRDTDGGVAAAIIATANLP	880
	*****	

9a5c	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
J1a12	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1065
U24d	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
Fb7	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
3124	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
Hib4	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1065
Pr8x	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
XRB	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
B111	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
Temecula1	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1315
M12	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
M23	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1440
GB514	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1315
Ann-1	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1190
Dixon	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	940
Mul-MD	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1065
Mullberry	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	1315
ATCC35871	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	940
Griffin-1	QAYIPGRGMTSVGVSRYRQSAIAVGVSSVSESGRWVFKFSGSANTRSQVIGAGVGYQW	940
	*****	

## 7.2 Resequenciamento de segmentos de *xadA3* das cepas 3124, Pr8x e Hib4

O alinhamento mostrado na Figura 30 exemplifica estas alterações na cepa 3124. O sequenciamento mostrou que estes polimorfismos não existem na cepa 3124. Baseado no resequenciamento do amplicon dessa região genômica, os polimorfismos de sequência não se confirmaram. Sendo assim a sequência de *xadA3* de 3124 idêntica a de 9a5c com exceção do nucleotídeo 411, troca de T (9a5c) por C (3124), mas que não muda o aminoácido, continua sendo um D.

```

9a5c          ATTTG-CTGGCTTCTGGAGCCAACAGCAGTAATGTGG-TGCCGGGTGAGTCGGTGGATCT 1853
3124_F_3ng   ATTTG-CTGGCTTCTGGAGCCAACAGCAGTAATGTGGTGGGTGCCGGGTGAGTCGGTGGATCT 831
3124         ATTTG-CTGGCTTCTGGAGCCAACAGCAGTAATGTGG-TGCCGGGTGAGTCGGTGGATCT 1854
3124_F_lng   -----

9a5c          GAAGAATAGTGA-CGGGAACTCTTAATCACCCAAAACAACCGACAGTAATGATGTGACTT 1912
3124_F_3ng   GAAGA-TACTGA-CGGGAACTCTTAATCACCCAAAACAACCGACAGTAATGATGTGACTT 889
3124         GAAGAATAGTGA-CGGGAACTCTTAATCACCCAAAACAACCGACAGTAATGATGTGACTT 1914
3124_F_lng   -----

9a5c          TTAATTTGGCCACTGCTTTAAAAGTAGACAGTTTACCCTGGCAACACGGCGATGACG 1971
3124_F_3ng   TTATTTGGCCACTGCTC---AAGTAGACAGGTTGGACCACTGGCA-CACGGCCATGA-- 943
3124         TTAATTTGGCCACTGCTTTAAAAGTAGACAGTTTACCCTGGCAACACGGCGATGACG 1973
3124_F_lng   -----

```

**Figura 30. Resequenciamento de um trecho de *xadA3* da cepa 3124.** Em vermelho os polimorfismos identificados na sequência original e não confirmados no sequenciamento pelo método de Sanger. Erros no sequenciamento Sanger em rosa.

O resequenciamento de *xadA3* na cepa Pr8x (Figura 31), mostrou que as inserções de T na posição 1545 e na posição 1948 não se confirmaram. Sendo assim a sequência de Pr8x praticamente idêntica a de 9a5c, exceto por uma troca de T por C que não altera o aminoácido codificado.

De modo similar, também verificamos erros no sequenciamento do genoma da cepa Hib4, um deles resultando em uma inserção que é inexistente de acordo com o sequenciamento pelo método de Sanger. *XadA3* de Hib4 tem tamanho menor que as demais cepas, o que foi confirmado por *immunoblotting* (Figura 10).

```

9a5c      TTAAATCAOCCAAAGCAATCGGCATCAATGATGTGACTTTTAAATTTGGCCACTGCTTTAGA 1559
Pr8x     TTAAATCAOCCAAAGCAATCGGCATCAATGATGTGACTTTTAAATTTGGCCACTGCTTTAGA 1560
Pr8x_3ng TTAAATCAOCCAAAGCAATCGGCATCAATGATGTGACTTTTAAATTTGGCCACTGCTTTAGA 593
*****

9a5c      AGCGSACAGTTTGACCACTGGCAACACGCGGATGACGACCGATGGTGTGACGGTGGGTAG 1619
Pr8x     AGCGSACAGTTTGACCACTGGCAACACGCGGATGACGACCGATGGTGTGACGGTGGGTAG 1620
Pr8x_3ng AGCGSACAGTTTGACCACTGGCAACACGCGGATGACGACCGATGGTGTGACGGTGGGTAG 593
*****

9a5c      TAACGTGACGTTGGGCTCGACGGGATTAGTTTATACAGATGGTCCGTCTGTGACACAGCTC 1679
Pr8x     TAACGTGACGTTGGGCTCGACGGGATTAGTTTATACAGATGGTCCGTCTGTGACACAGCTC 1680
Pr8x_3ng TAACGTGACGTTGGGCTCGACGGGATTAGTTTATACAGATGGTCCGTCTGTGACACAGCTC 653
*****

9a5c      GGGCATTAGGCGCGGTAAACCAAAGATTAAGATGTTGCCCGAGTACTCGGGATACCGA 1739
Pr8x     GGGCATTAGGCGCGGTAAACCAAAGATTAAGATGTTGCCCGAGTACTCGGGATACCGA 1740
Pr8x_3ng GGGCATTAGGCGCGGTAAACCAAAGATTAAGATGTTGCCCGAGTACTCGGGATACCGA 713
*****

9a5c      TGGCTCAACTTTAGCCAGTTGCAAGCGGTGACGACTACGGCCAGTAGGGTTGGAAATT 1799
Pr8x     TGGCTCAACTTTAGCCAGTTGCAAGCGGTGACGACTACGGCCAGTAGGGTTGGAAATT 1800
Pr8x_3ng TGGCTCAACTTTAGCCAGTTGCAAGCGGTGACGACTACGGCCAGTAGGGTTGGAAATT 773
*****

9a5c      GCTGGCTTCTGGAGCCAAACAGCAGTAATGTGGTG-CCGGGTGAGTGGTGGATCTGAGGA 1858
Pr8x     GCTGGCTTCTGGAGCCAAACAGCAGTAATGTGGTG-CCGGGTGAGTGGTGGATCTGAGGA 1859
Pr8x_3ng GCTGGCTTCTGGAGCCAAACAGCAGTAATGTGGTG-CCGGGTGAGTGGTGGATCTGAGGA- 832
*****

9a5c      ATAGTGAOAGGACCTCTTAATCACCAAACACCGACAGTAAATGATGACTTTTAAATT 1918
Pr8x     ATAGTGAOAGGACCTCTTAATCACCAAACACCGACAGTAAATGATGACTTTTAAATT 1919
Pr8x_3ng ATAGTGAOAGGACCTCTTAATCACCAAACACCGACAGTAAATGATGACTTTTAAATT 892
*****

9a5c      TGGCCACTGCTTTAAAAGTAGACAG-TTTGACCACTGGCAACACGGCGATG-ACGACCGA 1976
Pr8x     TGGCCACTGCTTTAAAAGTAGACAG-TTTGACCACTGGCAACACGGCGATG-ACGACCGA 1978
Pr8x_3ng TGGCCACTGCTTTAAAAGTAGACAG-TTAGACAGTTGGAACTACTG--CACACG-CGATGAAOAGCGA 947
*****

```

**Figura 31.** Resequenciamento de um trecho de *xadA3* da cepa Pr8x. Em vermelho os polimorfismos identificados na sequência original e não confirmados no sequenciamento pelo método de Sanger.

```

9a5c      GCTGAATCTGTGGTGGTGGATTGACTGCTTCGGGACCAACAGCAGTAATGTG 1080
Hib4     GCTGAATCTGTGGTGGTGGATTGACTGCTTCGGGACCAACAGCAGTAATGTG 1080
Hib4_3ng -----TGGTGGATTTGAGTGGTGGACCAACAGCAGTAATGTG 35
*****

9a5c      GCGTGGGTGAGTCGGTAGATTGAAGATAGTGAAGGACCTCTTAATCACCAAACA 1140
Hib4     GCGTGGGTGAGTCGGTAGATTGAAGATAGTGAAGGACCTCTTAATCACCAAACA 1140
Hib4_3ng GCGTGGGTGAGTCGGTAGATTGAAGATAGTGAAGGACCTCTTAATCACCAAACA 115
*****

9a5c      ACAGCAGCAATGATGACTTTTAA-----TTGGCCACTGCTTTAAAAGTGG 1189
Hib4     ACAGCAGCAATGATGACTTTTAA-----TTGGCCACTGCTTTAAAAGTGG 1200
Hib4_3ng ACAGCAGCAATGATGACTTTTAA-----TTGGCCACTGCTTTAAAAGTGG 164
*****

9a5c      ACAGTTGACCACTGGCAACCGGATGACGACCGATGGTGTGACGTTGGCAGAGAG 1249
Hib4     ACAGTTGACCACTGGCAACCGGATGACGACCGATGGTGTGACGTTGGCAGAGAG 1260
Hib4_3ng ACAGTTGACCACTGGCAACCGGATGACGACCGATGGTGTGACGTTGGCAGAGAG 224
*****

9a5c      TGACCTGGATTGACAGGATGATGATGGGAGGTCCTCGGTAAATCACTTGGGCA 1309
Hib4     TGACCTGGATTGACAGGATGATGATGGGAGGTCCTCGGTAAATCACTTGGGCA 1320
Hib4_3ng TGACCTGGATTGACAGGATGATGATGGGAGGTCCTCGGTAAATCACTTGGGCA 204
*****

9a5c      TTAATGCGCCGCGCAAAAGATCAATGATGTTGGACCGGTACTCGGGATACAGCAG 1269
Hib4     TTAATGCGCCGCGCAAAAGATCAATGATGTTGGACCGGTACTCGGGATACAGCAG 1280
Hib4_3ng TTAATGCGCCGCGCAAAAGATCAATGATGTTGGACCGGTACTCGGGATACAGCAGCTG 244
*****

9a5c      TCAACTTGGTCACTGCAAGCGGTGACGACGACAGCAGCAGGCTGGAAATTGCTAG 1429
Hib4     TCAACTTGGTCACTGCAAGCGGTGACGACGACAGCAGCAGGCTGGAAATTGCTAG 1436
Hib4_3ng TCAACTTGGTCACTGCAAGCGGTGACGACGACAGCAGCAGGCTGGAAATTGCTAG 400
*****

9a5c      CTTTGGAAACCAACAGCAGTAATGCGGCGCGGTTGCTGGTGGACTGAAGAACTAG 1489
Hib4     CTTTGGAAACCAACAGCAGTAATGCGGCGCGGTTGCTGGTGGACTGAAGAACTAG 1489
Hib4_3ng ----- 1489
*****

9a5c      AFGGAACTCTTAATCACCAAACAGTGGCAGTAAATGATGACTTTTAAATTGGCCA 1549
Hib4     AFGGAACTCTTAATCACCAAACAGTGGCAGTAAATGATGACTTTTAAATTGGCCA 1547
Hib4_3ng -----A 401
*****

9a5c      CTGCTTTAGAAGCGGACAGTTTACCACTGGCAACCGGATGACACCGATGGTGTGA 1609
Hib4     CTGCTTTAGAAGCGGACAGTTTACCACTGGCAACCGGATGACACCGATGGTGTGA 1443
Hib4_3ng CTGCTTTAGAAGCGGACAGTTTACCACTGGCAACCGGATGACACCGATGGTGTGA 207
*****

9a5c      CGTGGGTAGTAACTGACGTTGGGCTGACCGGATTAATTAACAGATGGTCCGCTG 1669
Hib4     CGTGGGTAGTAACTGACGTTGGGCTGACCGGATTAATTAACAGATGGTCCGCTG 1669
Hib4_3ng ----- 1669
*****

9a5c      TGACCAGCTCGGGCATTAGCGCCGTAACCAAAGATAAGGATGTCGCGCAGTACTG 1729
Hib4     TGACCAGCTCGGGCATTAGCGCCGTAACCAAAGATAAGGATGTCGCGCAGTACTG 1729
Hib4_3ng ----- 1729
*****

9a5c      CGGATACGATGCGCTCAACTTGGCAGTTGCAAGCGGTGACGACTACCGCAGTAGGG 1789
Hib4     CGGATACGATGCGCTCAACTTGGCAGTTGCAAGCGGTGACGACTACCGCAGTAGGG 1789
Hib4_3ng ----- 1789
*****

9a5c      GTTGAATTGCTGGCTTCTGGACCAACAGCAGTAATGGTGGTCCGGGTGAGTGGTGG 1849
Hib4     GTTGAATTGCTGGCTTCTGGACCAACAGCAGTAATGGTGGTCCGGGTGAGTGGTGG 1485
Hib4_3ng GTTGAATTGCTGGCTTCTGGACCAACAGCAGTAATGGTGGTCCGGGTGAGTGGTGG 489
*****

9a5c      AACTGAGATAGTGGGACCTCTTAATCACCAAACACCGACAGTAAATGATGTA 1909
Hib4     AACTGAGATAGTGGGACCTCTTAATCACCAAACACCGACAGTAAATGATGTA 1545
Hib4_3ng AACTGAGATAGTGGGACCTCTTAATCACCAAACACCGACAGTAAATGATGTA 509
*****

```

**Figura 32.** Resequenciamento de um trecho *xadA3* da cepa Hib4. Em vermelho os polimorfismos preditos, sendo que nem todos foram confirmados no sequenciamento pelo método de Sanger. O longo trecho tracejado está de fato ausente em Hib4 e resulta em uma proteína de menor massa molecular.

## 7.3 Obtenção do anticorpo Anti-XadA3

### 7.3.1 Clonagem de *xadA3*

Para realização da clonagem de *xadA3* foi escolhido um segmento da porção codificadora N-terminal da CDS XF1981 da cepa 9a5c de *X. fastidiosa*, que é variável e diferente das proteínas XadA1 e XadA2. Para tal, foram planejados oligonucleotídeos específicos visando a geração de produtos com tamanho de aproximadamente 1000 pares de bases. Foram planejados dois pares de *primers*, um denominado F1, que amplifica do 1º ao 451º aminoácido (1353 pb) e contém no início da sequência a região codificadora de um peptídeo sinal putativo. O segmento (posição 1 a 91) que supostamente compreende o peptídeo sinal foi inferido a partir de análises que realizamos com o programa SignalP 4.0 e pela comparação com informações da literatura. Vários membros do sistema de secreção tipo V, como por exemplo, proteínas autotransportadoras, foram anotados tendo uma longa sequência sinal N-terminal não usual, que excede 50 aminoácidos em comprimento (Henderson *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 2005; Desvaux *et al.*, 2006). Incluímos nestes oligonucleotídeos sítios para as enzimas de restrição *NcoI* (oligonucleotídeo direto) e *XhoI* (oligonucleotídeo reverso) (Tabela 3). As sequências de *xadA3* contendo as sequências dos oligonucleotídeos planejados para F1 podem ser visualizados na Figura 33.

O *primer* F2 exclui a porção do peptídeo sinal, amplificando do 92º ao 451º aminoácido (1080 pb). A clonagem desse segmento foi realizada, mas a expressão recombinante não foi adiante (dados não apresentados).

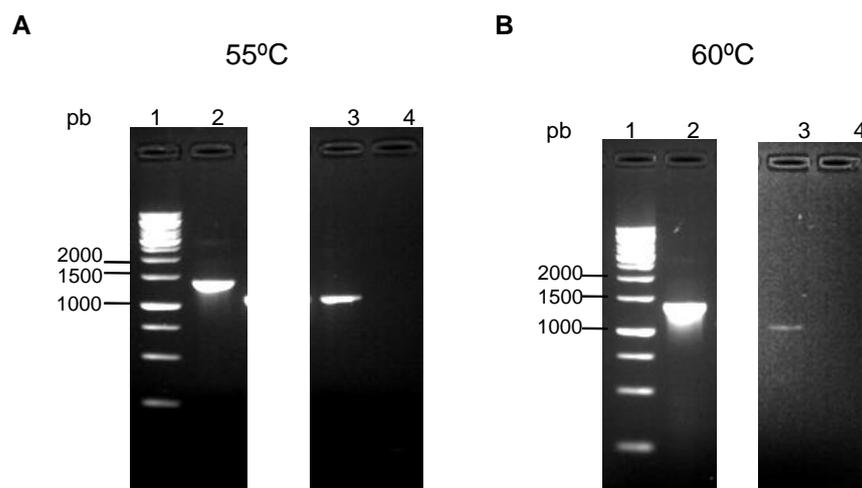
```

GGAGTATTGCCATGGAAAATTCATACTGCACTGCCCATGGTTCGGTTGGGTGGAATCGAAGG
TGTTGATCCATTATTTTGGCCGAAATACAAGATCGGTTCAGTTCGCTGCAAC
ACGCAGTGATGACGTCAGCAGCTTCAAGTAAAAAGGTACGCAGCCACGA
CGTTCCAACAATGCGATGACAGCTAAGCGTAGCGGAAACTGCACGACCG
GAGGCAGTTGCACATTGTCTTATTGACAGTGTTCAGCCTCAACGGGAT
ATACGGGAAAGTAGCAGCTCAAGTCCATGGAAAATTCGACTCGACTGAA
AATTGCGTAGAAAATACTGGGCACAGTAGTCAGACATCCTTCATTCATAG
TGCTTCTAACGATAAATGCAAGCCAGATTCACGCAAACAGAGTATCCCG
TGTTTTATGATTATAGAAACCTGGTTCCTGGTGGGTCCTATATGTCAAT
GAGGGTAAACTCGGGCTAGTCGATATTTCTGGTGAACCTATTCTATGCG
CCTAGGCAGCATTGCTACCATGAATGGCTCGGCTGGCATAGATTTCGATTG
CCATCGGTTCCAGGGCAAGGTTCCAAAACGGATGGGAATACCAGCGCGCC
ACTGTAGCACAGGGGCTGCGTTCGATTGCGATTGGTACTACGGCCCGTTC
GCAATCTCAAGATGCGATTTCTATAGGGACCGGTGCATCCACTACAGGCA
ATTTTTCGATAGCGATAGGTAATGGAGCATTGACATCAATTGCCAATGGG
ATAGCGCTTGGTGCATCAAGCAGTGTACCACAAGAGGAGGCGTGGCACT
GGGACAAGGCTCGCTGGCTGCGACCGCTTCTGGCATTACTGGCTATGATC
CGGTACCAAGAGCACCTCGACTCTTTCCACGTCAATGTGGAGAAGTACG
TTGGGGCAGTCAGTATCGGTAATATAACCTCTAGCACCTCCCAGACACG
TCAACTTACAGGATTGGCGGCAGGTAGGTTCAGATACGGATGCGGTGAATG
TTGCCAGCTGAAGTTGCTTGCTGAATCTGTGGTGGTGGTTGGAATTTG
ACTGCTTCGGAGCCAACAGCAGTAATGTGGCGCTGGGTGAGTCGGTAGA
TTTGAAGAATAGTGATGGGAACCTCTTAATCACCAAACAACCGACAGCA
ATGATGTGACTTTTAATTTGGCCACTGCTTTAAAAGTGGACAGTTTGACC
ACTGGCAACACGGCGATGACGACCGATGGTGTGACGGTGGGCAAGAGAGT
GACCTTGGATTGACAGGATTAGTGATTGCGGAAGGTCCCTCGGTAATCA
GTTCCGGCATTAAATGCGGCCGCCCCAAAAGATCATGAATGTGGAAACGGGT
ACTGCGGATACAG

```

**Figura 33. Pares de oligonucleotídeos para clonagem de segmento do gene *xadA3* da cepa 9a5c de *X. fastidiosa*.** Segmento N-terminal de *xadA3* selecionado para clonagem. As sequências destacadas em cinza referem-se aos oligonucleotídeos planejados para a clonagem, F1, F2 e R, respectivamente. Em negrito/italico estão os sítios das enzimas de restrição NcoI (**CCATGG**) e XhoI (**CTGCGG**), respectivamente. Sequência de nucleotídeos obtida em (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>)

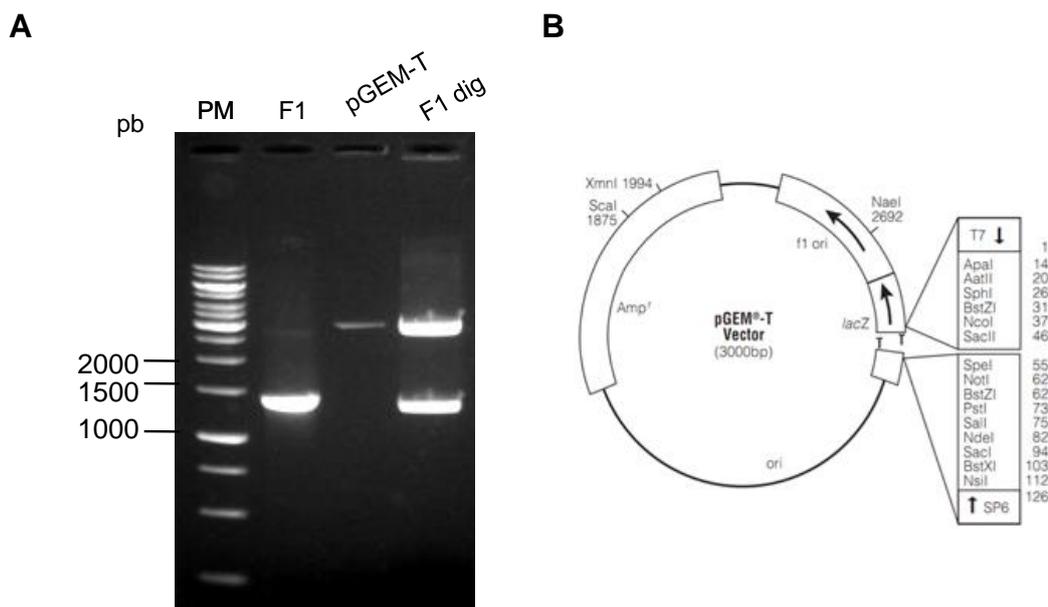
Para amplificação da região F1 de *xadA3* primeiramente foi extraído o DNA genômico da cepa 9a5c. Utilizando os pares de oligonucleotídeos planejados para a porção N-terminal de *xadA3* com peptídeo sinal (F1) (Tabela 3) obtivemos *amplicon* de tamanho esperado (~1,3 kb para F1), utilizando-se como molde DNA genômico da cepa 9a5c. Um teste foi realizado para verificação da melhor T<sub>m</sub> (*melting temperature* / temperatura de anelamento) para os oligonucleotídeos. A Figura 34 mostra este ensaio, no qual se pode determinar a temperatura de 55°C a melhor para a amplificação das regiões de interesse de *xadA3*.



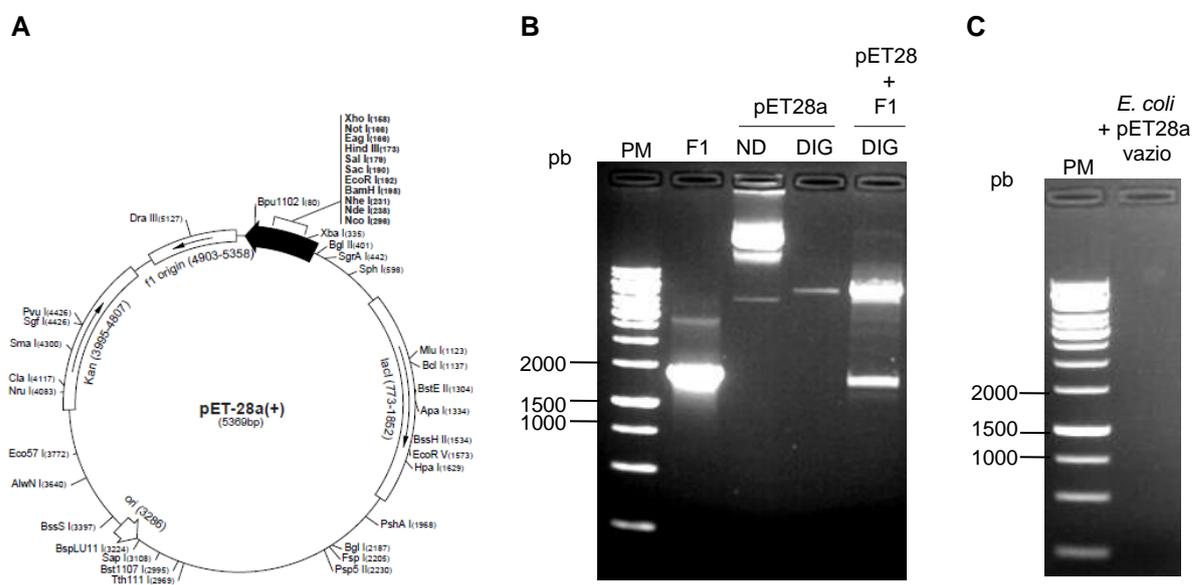
**Figura 34.** Análise eletroforética da reação de PCR realizada em Tms distintas. Em (A), a Tm foi de 55°C e em (B) foi utilizada Tm de 60°C. Para ambos os géis, nas canaletas 1: marcador de tamanho molecular DNA ladder 1Kb (Fermentas); canaletas 2: *amplicon* F1; canaletas 3: controle positivo (XF0078); canaletas 4: controle negativo.

Após purificação dos *amplicons*, foi realizada a clonagem do segmento F1 em vetor pGEM-T (Figura 35B), utilizando-se a cepa BL21(DE)3. A Figura 35 mostra a digestão das construções obtidas no pGEM-T, após extração do plasmídeo dos clones obtidos. Para liberação do inserto, procedemos com dupla digestão (*Nco*I e *Xho*I). O inserto gerado pela digestão (Figura 35) foi eluído do gel e subclonado no vetor de expressão pET28a (Figura 36A) previamente linearizado com as enzimas *Nco*I/*Xho*I. Para confirmação do sucesso destas clonagens no pET28a, a construção foi digerida simultaneamente com as enzimas de restrição *Nco*I e *Xho*I. A Figura 36 mostra o resultado da digestão das construções pET28a-XadA3F1 e, confirmando a clonagem. As canaletas 3 e 4 da Figura x mostram o resultado da amplificação dos segmentos de *xadA3* para um inóculo de *E. coli* contendo o plasmídeo pET28a sem inserto, como se esperava não houve amplificação, confirmando que a bactéria não tem nenhuma sequência semelhante a *xadA3*.

O vetor de expressão pET28a (*Novagen*) foi escolhido porque este insere uma calda de hexahistidina (*His-Tag*) na extremidade C-terminal ou N-terminal do inserto, dependendo dos sítios de clonagem utilizados, neste caso C-terminal.



**Figura 35.** Análise das construções de *xadA3* em pGEM-T. (A) Para confirmar a clonagem do segmento F1 de *xadA3*, as construções foram digeridas, com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. A canaleta 1 representa o *amplicon* F1. A canaleta 3 mostra o vetor pGEM-T não digerido e a canaleta 4 mostra a digestão da construção de F1 em pGEM-T, transformados em BL21(DE)3. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O marcador de tamanho 1Kb DNA ladder foi aplicado na canaleta PM. (B) Esquema do vetor pGEM-T.



**Figura 36.** Análise das construções de *xadA3* em pET28a. (A) Esquema do vetor pET28a. (B) Para confirmar a clonagem do segmento F1 de *xadA3*, as construções foram digeridas, com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. A canaleta 2 representa o *amplicon* do segmento F1 e na canaleta 4 a digestão do plasmídeo. As canaletas 3 e 4 mostram o vetor pET28a não digerido e digerido, respectivamente. (C) Amplificação a partir de uma colônia de *E. coli* transformada apenas com o vetor pET28a vazio. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O marcador de tamanho 1Kb DNA ladder foi aplicado na canaleta PM.

A fim de confirmarmos as sequências de nucleotídeos dos clones selecionados como correspondentes ao segmento desejado de *xadA3*, submetemos um clone de cada construção ao sequenciamento automatizado (método Sanger). Utilizamos os oligonucleotídeos mostrados na Tabela 5.

A Figura 37 mostra o resultado do sequenciamento automatizado para o segmento F1 de *xadA3*, que contém a sequência do peptídeo sinal. As sequências obtidas pelo sequenciamento foram recuperadas no programa BioEdit e alinhadas com a sequência de XF1981, podendo então observar os sítios das enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* seguida da cauda de seis histidinas inserida pelo vetor pET28a, destacadas em cinza. O códon iniciador anotado pelo NCBI para *XadA3* está destacado em azul, com subsequente sequência de peptídeo sinal (35 aminoácidos ou 105 pb). Este banco de dados desconsidera os primeiros 55 aminoácidos (165 pb) que é anotado no *X. fastidiosa* Genome Project (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>) e no IMG-ER. Como não temos a certeza se isto é um erro de anotação consideramos o peptídeo sinal desde o primeiro códon anotado pelo *X. fastidiosa* Genome Project (90 aminoácidos / 270 pb). Foram detectadas 4 mutações pontuais introduzidas na PCR, das quais somente uma causou mudança de aminoácido, a qual não pareceu ser prejudicial para o restante dos experimentos.

Após confirmação da sequência do inserto recombinante, iniciamos testes de expressão da proteína recombinante visando a produção de anticorpos anti-*XadA3*.

```

1   atgcaaatcactactgcaactgcccatggttcgggttgggtggaatcgaaggtgttgatcca
      M V R L G G I E G V D P
61  ttatTTTTgcccgaataacaagatcgggtcagtcgctgcaacacgcagtgatgacgctcagca
      L F L P K Y K I G Q S L Q H A V M T S A
121 gcttcaagtaaaaaaggtacgcagccacgcagcttccaacaatgcgatgacagctaagcgt
      A S S K K G T Q P R R S N N A M T A K R
181 agcgcgaactgcacgaccggagggcagttgcacatcgtcttattgacagtgcttgcagcc
      S A K L H D R R Q L H I V L L T V L A A
241 tcaacgggatatacggggaaaagtagcagctcaagtctatgtaaattccgactcgactgaa
      S T G Y T G K V A A Q V Y V N S D S T E
301 aattgcgtagaaatactgggcgacagtagtcagacatccttcattcatatgcttctaac
      N C V E I L G D S S Q T S F I H S A S N
361 gataaatgcaagccagatctcagcaaacagagtattccctgttttatgattatagaana
      D K C K P D F T Q T E Y S L F Y D Y R N
421 ctggttcttgggtgggtccttatatgtcaatgagggtaaacctgggctagtcgatattct
      L V L G G S L Y V N E G K L G L V D I S
481 ggtgcaacttattctatgcgctagcagcattgctaccatgaatggctcggctggcata
      G A T Y S M R L G S I A T M N G S A G I
541 gattgggatgccaatcggttcagggcaaggttccaaaaaggatgggaaatcaccgagcggcc
      D W I A I G S G Q G S K T D G N T S G A
601 actgtagcacaggggctcgcttgcgattggtactacgcccgttcgcaatctca
      T V A Q G L R S I A I G T T A R S Q S Q
661 gatgcatcttctatagggaccggtgcatccactacagcaatTTTTgcatagcagataggt
      D A I S I G T G A S T T G N F A I A I G
721 aatggagcattgacatcaattgccaatgggatagcgttgggtgcatcaagcagatgac
      N G A L T S I A N G I A L G A S S S V T
781 acaaggggagggcgtggcactgggacaaggctcgctggctgacccgttctggcattact
      T R G G V A L G Q G S L A A T A S G I T
841 ggctatgacccggtagcacaagagcacctcgactctttccacgtcaatggtggagaatcag
      G Y D P V T K S T S T L S T S M W R S T
901 ttgggggagtcagtagtcggtaatataacctctagcacctcccagacacgtcaacttaca
      L G A V S I G N I T S S T S Q T R Q L T
961 ggattggcggcaggtaggtcagatcggatgcggtgaatggtgccagctgaagtgtct
      G L A A G R S D T D A V N V A Q L K L L
1021 gctgaatctgtgggtggtggtggaatttgactgcttccggagccaacagcagtaatgtg
      A E S V G G G W N L T A S G A N S S N V
1081 gcgctgggtgagtcggtagatttgaagaatagtgatgggaacctcttaaccacaaaaca
      A L G E S V D L K N S D G N L L I T K T
1141 accgacagcaatgatgtgacttttaattggcactgctctaaaaagtgacagcttgacc
      T D S N D V T F N L A T A L K V D S L T
1201 actggcaacacggcagtgacgaccgatggtgtgacggtgggcaagagagtgaccttgat
      T G N T A M T T D G V T V G K R V T L D
1261 tcgacaggattagtgattgcggaaggtccctcggtaatcagttcgggcataatgcgggcc
      S T G L V I A E G P S V I S S G I N A A
1321 ggcaaaaagatcatgaatggtggaacgggtctcgagaccaccaccaccaccactga
      G Q K I M N V G T G L E H H H H H H -

```

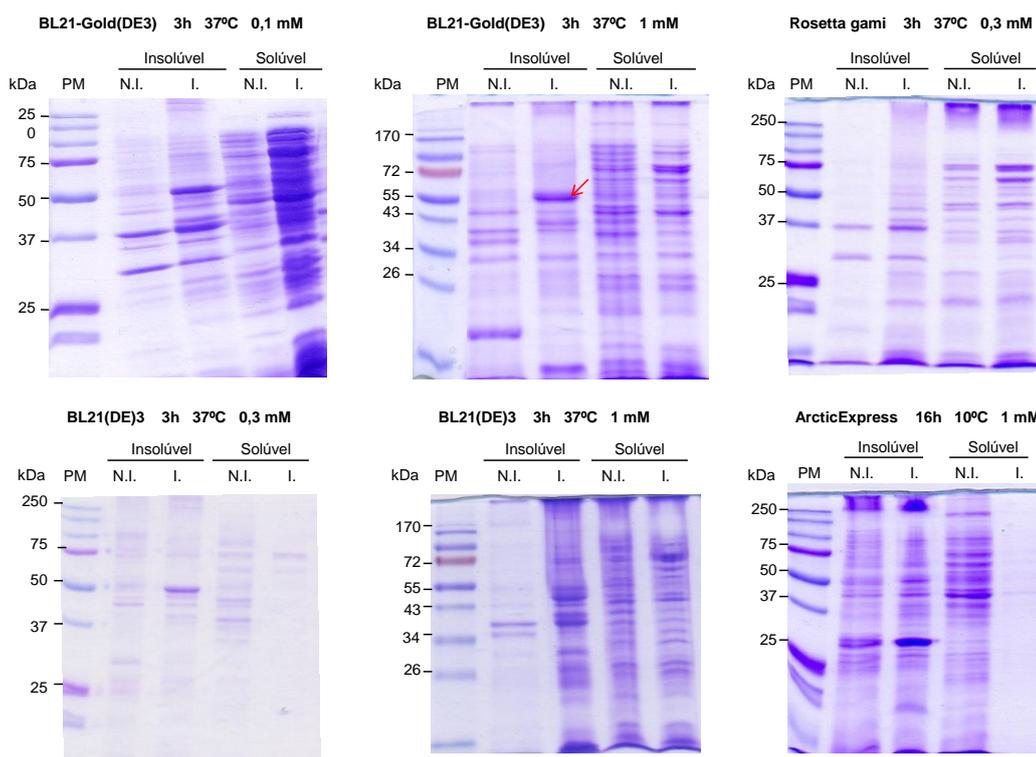
**Figura 37.** Clonagem da sequência N-terminal de *xadA3*, com peptídeo sinal (F1), no vetor de expressão pET28a. O aminoácido destacado em azul é a metionina inicial para XF1981. Em negrito, mutações de bases (1ª posição 216, T por C; 2ª posição 545, C por G – mudou S (Serina) para W (Triptofano); 3ª posição 786, A por G; 4ª posição 1180, T por C). Os sítios das enzimas de restrição *Nco*I e *Xho*I gerados pelos oligonucleotídeos utilizados no PCR para amplificação de F1 estão representados em cinza. A proteína recombinante XadA3 é acrescida no C-terminal com uma cauda de seis histidinas, região após o sítio de restrição de *Xho*I. 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>).

### 7.3.2 Expressão e purificação de XadA3 recombinante

A construção pET28a-XadA3 foi então utilizada para expressão da porção N-terminal de XadA3 recombinante em *E. coli*. Para avaliar a melhor condição em que a proteína XadA3 recombinante poderia ser expressa foi realizado preliminarmente

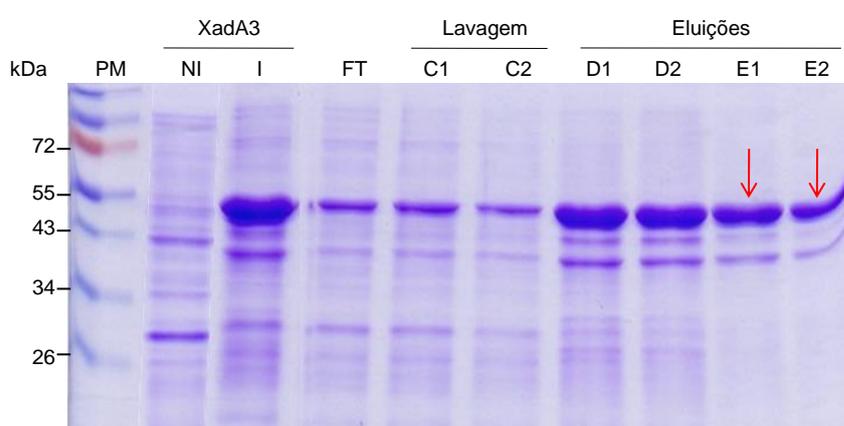
um estudo de indução empregando as cepas BL21(DE3), BL21-Gold(DE3), Rosetta gami e ArcticExpress, como descrito no item 3.18).

Verificamos que a condição mais eficiente foi a indução por BL21-Gold(DE3) com 1 mM de IPTG, a 37°C por 3 horas (como indicado pela seta na Figura 38), sendo esta condição escolhida para indução em maior escala. Como pode ser constatado na Figura 38, a adição de glicose 1% ao meio de cultura antes da adição de IPTG impediu completamente a expressão basal da proteína recombinante (canaleta 1). A proteína recombinante foi recuperada na fração insolúvel do extrato bacteriano (Figura 9, canaleta 2). XadA3 recombinante submetida a SDS-PAGE exhibe uma massa molecular de ~46 kDa, a qual está de acordo com a massa molecular calculada pelo programa Compute pI/Mw (45.937,27 Da) acrescida do segmento C-terminal adicional conferido pelo vetor pET28a. Este segmento C-terminal contém a cauda de seis histidinas.



**Figura 38.** Análise da expressão de XadA3 recombinante em cepas de *E. coli* por SDS-PAGE corado com azul de Comassie. Indução em diferentes cepas de *E. coli* com diferentes concentrações (mM) de IPTG, tempo e temperatura. (N.I.) Cultura bacteriana não induzida e (I.) induzida para as frações solúveis e insolúveis geradas após a lise das células bacterianas. Os padrões de massa molecular relativa utilizados (canaleta PM) foram *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (10 – 250 kDa) e *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10 – 170 kDa).

A proteína XadA3 recombinante recuperada na fração insolúvel do lisado bacteriano foi purificada em cromatografia de afinidade em resina Ni<sup>2+</sup>-NTA. Como mostrado na Figura 39, a proteína foi totalmente adsorvida na resina e níveis adequados de eluição foram atingidos com o tampão E. Avaliamos que a cromatografia em Ni<sup>2+</sup>-NTA da fração insolúvel de bactérias induzidas a 37°C resultou em um grau de purificação satisfatório e que a quantidade de XadA3 obtida (aproximadamente 800 µg) seria suficiente para imunização do coelho e consequente produção de anticorpos anti-XadA3.



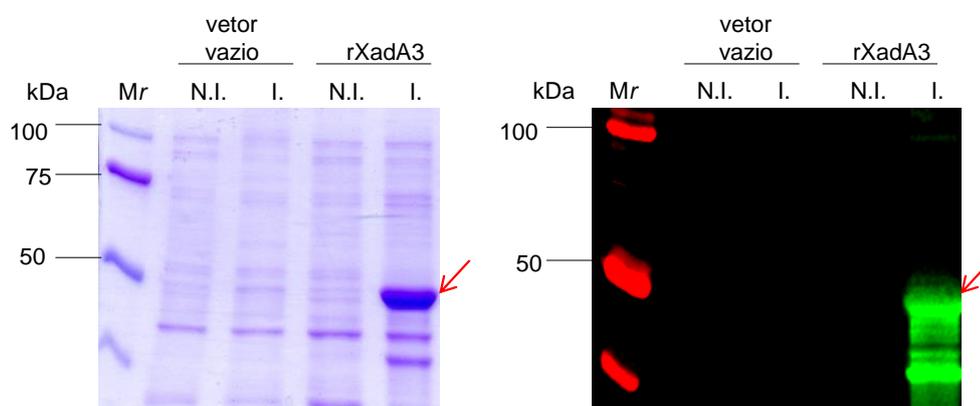
**Figura 39.** Purificação de XadA3 recombinante por afinidade à níquel. Alíquotas correspondentes a 10 µg da fração solúvel da cultura não induzida com IPTG (canaleta 1) e 10 µg da fração solúvel da cultura induzida com IPTG (canaleta 2) foram analisadas por SDS-PAGE 15% e coloração com Coomassie Blue. A fração insolúvel do lisado de bactérias induzidas foi purificada por cromatografia de afinidade em Ni<sup>2+</sup>-NTA (Qiagen). A canaleta 3 mostra a fração não adsorvida à resina, as canaletas 4 e 5 referem-se às lavagens com tampão C, as canaletas 6 e 7 referem-se às eluições com tampão D e as canaletas 9 e 10 referem-se às eluições com tampão E. (PM) *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (10 – 170 kDa). A seta indica o polipeptídeo de aproximadamente 46 kDa que corresponde a XadA3 recombinante.

### 7.3.3 Análise da Produção de anticorpos anti-XadA3

Em sequência à purificação, foram preparadas duas alíquotas de 400 µg de proteína XadA3 recombinante para imunização do coelho. Apesar de obtermos um grau de purificação bom para a proteína XadA3 recombinante por cromatografia de afinidade, decidimos também separá-las por gel de SDS-PAGE 15% para aumentar a chance de inocularmos no coelho somente a proteína correspondente ao tamanho esperado, obtendo assim anticorpos mais específicos para a proteína de interesse.

Além disso, a utilização de amostras de antígeno misturada ao gel de poliacrilamida macerado induz uma melhor resposta imune no coelho segundo a técnica do biotério. A banda foi processada como descrito no item 3.20.

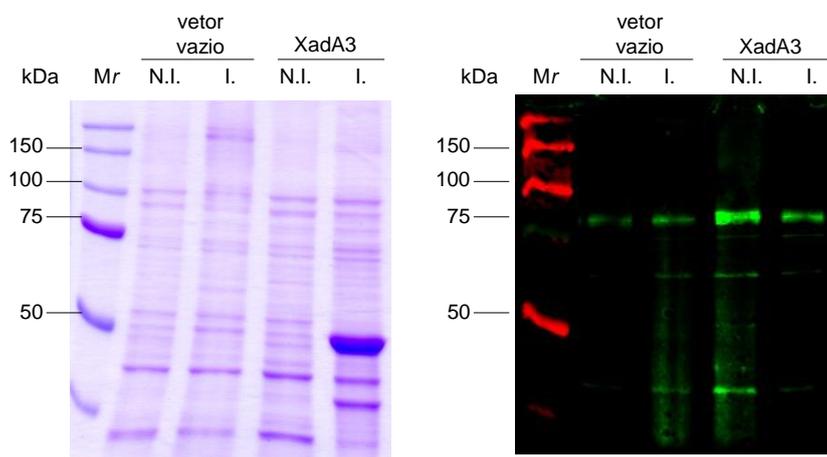
As amostras de sangue do coelho, imunizado com um segmento da proteína XadA3 recombinante foram coletadas para análise dos anticorpos. O soro das amostras de sangue pré-imune do coelho e após 14, 28, 42 e 60 dias de inoculação com o antígeno foram parcialmente purificados por precipitação com sulfato de amônio seguido de diálise, como descrito no item 3.20. Diversas diluições dos soros assim obtidos foram testadas através de *Immunoblotting* para detecção de XadA3 recombinante (dados não apresentados). A diluição de 1:2000 do soro obtido após 60 dias de imunização se mostrou adequada exibindo razoável especificidade e menor ruído, como mostra a Figura 40, onde podemos verificar nitidamente a banda correspondente a proteína recombinante (~46 kDa). O anticorpo também detectou um polipeptídeo de menor tamanho que talvez corresponda a produto de degradação da proteína recombinante.



**Figura 40.** Análise do anticorpo policlonal anti-XadA3. O extrato total de culturas de *E.coli* BL21-Gold DE3 transformada com vetor pET28a vazio ou com a construção pET28a-XadA3 não-induzidas (NI) e induzidas (I) com IPTG foi separado em SDS-PAGE/poliacrilamida 10%, seguindo-se coloração com Coomassie blue (à esquerda) e *Immunoblotting* (à direita) com anti-XadA3 na diluição de 1:2000. A detecção foi realizada com anticorpo secundário fluorescente *anti-rabbit* 800 (*Li-Cor*) na diluição 1:15000. A imagem foi capturada no equipamento *Odyssey Infrared Imaging System*. O padrão de massa molecular relativa (*Mr*) utilizado foi *™Precision Plus Protein Dual Color Standards* (10-250 kDa). A seta vermelha indica a proteína recombinante.

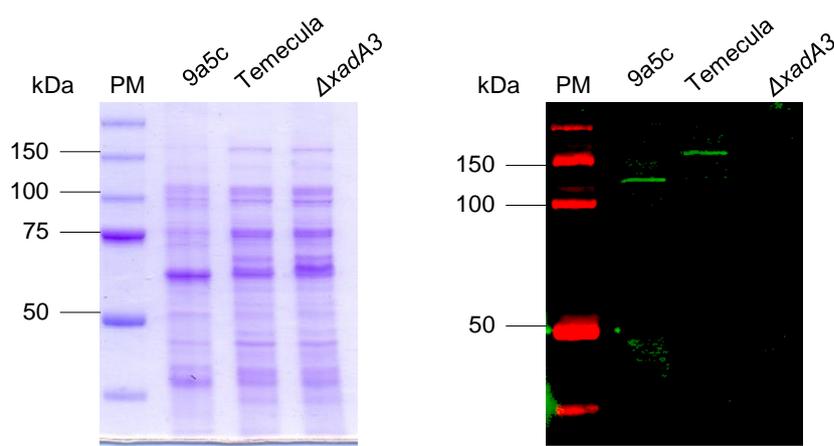
A amostra de sangue pré-imune processada foi também analisada como controle para verificar se o coelho utilizado para produção do anticorpo já possuía

algum anticorpo que reconhecesse XadA3. O resultado está apresentado na Figura 41, onde se pode observar que na altura de ~46 kDa, região de interesse, não há nenhuma banda.



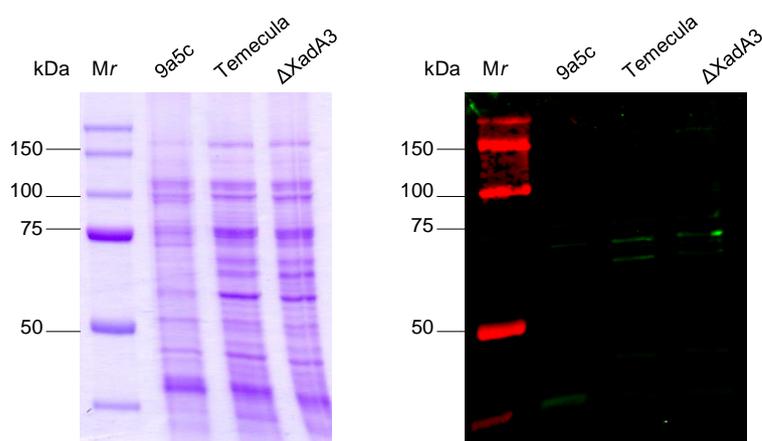
**Figura 41. Análise da amostra de soro pré-imune.** O extrato total de culturas de *E.coli* BL21-Gold DE3 transformada com vetor pET28a vazio ou com a construção pET28a-XadA3 não-induzidas (NI) e induzidas (I) com IPTG foi separado em SDS-PAGE 10%, seguindo-se coloração com Coomassie blue (à esquerda) e ) e *Immunoblotting* (à direita) com soro pré-imune na diluição de 1:2000. A detecção foi realizada com anticorpo secundário fluorescente *anti-rabbit* 800 (*Li-Cor*) na diluição 1:15000. A imagem foi capturada no equipamento *Odyssey Infrared Imaging System*. O padrão de massa molecular relativa (*Mr*) utilizado foi <sup>TM</sup>Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa).

O anticorpo policlonal anti-XadA3 foi então testado contra o extrato total das cepas 9a5c e Temecula de *X. fastidiosa* (Figura 42). Observamos bandas correspondentes a polipeptídeos únicos da proteína XadA3 com tamanhos distintos nessas cepas, confirmando o polimorfismo observado nas predições *in silico* (Tabela 10). A cepa Temecula expressa uma proteína com massa molecular significativamente maior que a cepa 9a5c. Como esperado, o anticorpo não detecta nenhum polipeptídeo no extrato do mutante  $\Delta XadA3$  de *X. fastidiosa* (Figura 18).



**Figura 42.** Análise do anticorpo policlonal anti-XadA3 em extrato total de *X. fastidiosa*. Alíquotas de 10  $\mu$ g de extrato total da cepa 9a5c e Temecula foram separadas em SDS-PAGE 10% seguindo-se coloração com Coomassie blue (à esquerda) e *Immunoblotting* (à direita) com anti-XadA3 na diluição de 1:2000. A detecção foi realizada com anticorpo secundário fluorescente *anti-rabbit* 800 (*Li-Cor*) na diluição 1:15000. A imagem foi capturada no equipamento *Odyssey Infrared Imaging System*. O padrão de massa molecular relativa (*Mr*) utilizado foi <sup>TM</sup>Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa).

Ainda como controle analisamos a amostra de soro pré-imune em extratos totais das cepas 9a5c, Temecula e  $\Delta$ XadA3 de *X. fastidiosa*. Como mostra a Figura 43, não foram observadas bandas na região de interesse, entre 100 e 150 kDa.



**Figura 43.** Análise do soro pré-imune em extrato total de *X. fastidiosa*. Alíquotas correspondentes a 10  $\mu$ g de extrato total da cepa 9a5c, Temecula e  $\Delta$ XadA3 foram separadas em SDS-PAGE 10% seguindo-se coloração com Coomassie blue (à esquerda) e *Immunoblotting* (à direita) com soro pré-imune na diluição de 1:2000. A detecção foi realizada com anticorpo secundário fluorescente *anti-rabbit* 800 (*Li-Cor*) na diluição 1:15000. A imagem foi capturada no equipamento *Odyssey Infrared Imaging System*. O padrão de massa molecular relativa (*Mr*) utilizado foi <sup>TM</sup>Precision Plus Protein Dual Color Standards (10-250 kDa)

Em Branco

## 8 SÚMULA CURRICULAR

---

Ana Paula Silva de Souza  
Nascimento: 05/09/1987 – Santos, SP, Brasil.

---

### Formação Acadêmica

- 2006 - 2010 Graduação em Ciências Biológicas  
Licenciatura  
Bacharelado com ênfase em Biotecnologia  
Bacharelado com ênfase em Meio Ambiente  
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, São Paulo, Brasil
- 2011 - 2018 Curso de Doutorado Direto, Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica)  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva  
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 

### Formação Complementar

- 2008 - 2008 Iniciação Científica  
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, São Paulo, Brasil  
Orientadores: Profa. Dra. Kátia Maria Gomes Machado  
Dr. Oscar José Sallée Barreto  
Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PROIN) – UNISANTOS
- 

### Produção Científica

#### Participação em Congressos

**Souza, A. P. S.**, Zaini, P. A., Ionescu, M., Lindow, S.E, & da Silva, A. M. Molecular and Functional Analysis of the Trimeric Autotransporter Adhesin XadA3 of *Xylella fastidiosa*. In: 42a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu - PR

**Souza, A. P. S.**, Zaini, P. A., Ionescu, M., Lindow, S.E, & da Silva, A. M. Biochemistry and function of the XadAs trimeric autotransporter adhesins of *Xylella fastidiosa*. In: 1º São Paulo Xanthomonadaceae (Xantho) Meeting, 2015, São Paulo - SP.

#### Artigo científico

Amgarten, D., Martins, L. F., Lombardi, K. C., Antunes, L. P., **de Souza, A. P. S.**, Nicastro, G. G., Kitajima, E. W., Quaggio, R. B., Upton, C., Setubal, J. C. & da Silva, A. M. (2017). Three novel *Pseudomonas* phages isolated from composting provide insights into the evolution and diversity of tailed phages. BMC Genomics 18:ARTN 346.

#### Capítulo de livro

Feitosa-Jr, O., **Souza, A. P. S.** & da Silva, A. M. Immunoblotting In: Métodos em Bioquímica e Biologia Molecular. Editores: M.V. Marques, R.L. Baldini & R. Galhardo. (em edição)

---