

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

AVALIAÇÃO DE RIBOSWITCH *theo/metE* PARA SILENCIAMENTO GÊNICO  
EM *Xanthomonas citri*

DANILO BUENO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Agosto - 2018

DANILO BUENO

**AVALIAÇÃO DE RIBOSWITCH *theo/metE* PARA SILENCIAMENTO GÊNICO EM  
*Xanthomonas citri***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli

Rio Claro

2018

575.1 Bueno, Danilo  
B928a Avaliação de riboswitch theo/metE para silenciamento  
gênico em *Xanthomonas citri* / Danilo Bueno. - Rio Claro,  
2018

45 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Henrique Ferreira

Coorientadora: Danielle Biscaro Pedrolli

1. Genética. 2. Riboswitch. 3. Ferramenta genética. 4.  
Expressão gênica. 5. Xac. 6. Cancro cítrico. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE RIBOSWITCH theo/metE PARA SILENCIAMENTO GÊNICO EM *Xanthomonas citri*

**AUTOR: DANILO BUENO**

**ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA**

**COORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: MICROBIOLOGIA APLICADA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES  
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. PAULA MARIA MOREIRA MARTINS  
Laboratório de Biotecnologia / Instituto Agrônômico

Rio Claro, 27 de julho de 2018

Dedico este trabalho à minha esposa Michele, aos meus pais Luiz Antonio e Elena, à minha sogra Rosangela, e a todos os meus amigos e minha família.

## AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus em primeiro lugar pela minha vida, pela minha família e pelo meu trabalho, e também pela oportunidade de construir a minha obra através da Educação e da Ciência.

Agradeço à minha esposa Michele pela companhia nos momentos bons e ruins desta caminhada, principalmente por estar ao meu lado nos momentos difíceis, lutando comigo sempre por dias melhores e felizes. Obrigado por existir em minha vida, você é a alegria dos meus dias. Não poupo palavras ao dizer com sinceridade: eu te amo. Você é o amor da minha vida.

Agradeço aos meus pais Luiz Antonio e Elena por me mostrarem ao longo da vida que são nas coisas mais simples que a vida mostra seu valor. Obrigado por me mostrarem que a educação é o melhor caminho, por mais difícil que possa ser, a recompensa é enorme.

Agradeço a toda minha família, especialmente ao meu avô Aparecido, homem trabalhador e honesto, meu segundo pai. Também fico grato aos meus amigos de infância Pedro, Celso, André, Lucas e Isaque pela força, companheirismo e lealdade.

Agradeço à Rosângela, minha sogra, por tudo que me fez nesses anos de estudo, sempre me incentivando e mostrando que se você quer muito algo, você consegue, pois basta se esforçar.

Quero dizer obrigado ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Henrique Ferreira e aos colaboradores Prof<sup>a</sup> Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes e Prof<sup>a</sup> Dra. Daniela Alonso Bocchini e aos colegas de laboratório.

Agradeço à FAPESP pelo financiamento deste estudo (Processo FAPESP: 2016/18519-0) e ao CNPq.

Muito obrigado a todos.

## SUMÁRIO

pág

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Cancro cítrico</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 <i>Xanthomonas citri</i></b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 Riboswitches e o controle da expressão gênica</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4 Teofilina</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 <i>parB</i> e <math>\alpha</math>-amilase de <i>Xanthomonas citri</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.6 Hipótese</b> .....	<b>17</b>
<b>1.7 Objetivo geral</b> .....	<b>17</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Linhagem bacteriana e cultivo</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Biologia Molecular</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3 Construção de vetores de clonagem</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Construção das linhagens Xac</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5 Curvas de crescimento e análises estatísticas</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6 REMA e MBC</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7 qRT-PCR</b> .....	<b>26</b>
<b>2.8 Determinação de atividade de <math>\alpha</math>-amilase</b> .....	<b>27</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 Curvas de crescimento de Xac pDB1 e Xac pDB2</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2 REMA e MBC</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 Ensaio qualitativos e quantitativos envolvendo Xac pDB1</b> .....	<b>30</b>
3.3.1 RT-PCR.....	30
3.3.2 qRT-PCR - inibição da transcrição de <i>parB</i> .....	31
<b>3.4 Ensaio qualitativos e quantitativos com Xac pDB2</b> .....	<b>33</b>
3.4.1 Ensaio qualitativo de degradação de amido por Xac pDB2.....	34
3.4.2 Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase de Xac pDB2.....	35
3.4.3 Avaliação de inibição da transcrição de $\alpha$ -amilase por qRT-PCR.....	37
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>44</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>45</b>

## RESUMO

Estudos genéticos em qualquer organismo requerem ferramentas eficazes para se alterar a expressão gênica. Dentre estas, os riboswitches oferecem uma alternativa bastante atrativa para modulação da expressão de genes de interesse, onde é possível ligar e desligar tais genes sem a remoção dos mesmos dos genomas. Esta alternativa permite o estudo direto de um gene e a avaliação da sua falta (quando desligado ou “OFF”), bem como permite o reestabelecimento do selvagem sem a necessidade da complementação padrão (estado “ON”). Na busca por melhores condições de caracterização genética e do desenvolvimento de ferramentas dedicadas para estudos de genes essenciais ou de difícil caracterização em *Xanthomonas citri*, avaliamos o uso de um sistema de riboswitch *theo/metE* para o controle de expressão gênica nesta bactéria. A caracterização propriamente dita foi realizada alterando-se a expressão dos genes *parB* e  $\alpha$ -amilase. O sucesso destas estratégias permitiu o silenciamento dos genes *parB* e  $\alpha$ -amilase, e ainda, foi possível observar que a inibição da transcrição do gene  $\alpha$ -amilase refletiu em um decaimento da enzima  $\alpha$ -amilase estando o riboswitch *theo/metE* na presença de seu metabólito alvo, a teofilina. Os resultados indicam que o riboswitch *theo/metE* utilizado neste estudo é uma ferramenta genética em potencial para silenciamento gênico em *Xac*.

**Palavras-chaves:** ferramenta genética, expressão gênica, *Xac*, cancro cítrico.

## ABSTRACT

Genetic studies in any organism requires effective tools to change gene expression. Among these, the riboswitches offer a very attractive alternative to modulation of the expression of genes of interest, where it is possible to turn on and turn off such genes without removing them from the genomes. This alternative allows the direct study of a gene and the evaluation of its lack (when disconnected or "off"), as well as it allows the reestablishment without the necessity of the standard complementation (state "ON"). In the search for better conditions of genetic characterization and the development of tools dedicated to studies of essential genes or of difficult characterization in *Xanthomonas citri*, we evaluate the use of a system of riboswitch *theo/metE* for the control of gene expression in this bacteria. The characterization itself was performed by altering the expression of the *parB* and  $\alpha$ -*amylase* genes. The success of these strategies allowed the silencing of *parB* and  $\alpha$ -*amylase* genes, and it was also possible to observe that the inhibition of the transcription of the  $\alpha$ -*amylase* gene reflected in a decay of the  $\alpha$ -*amylase* enzyme while the riboswitch *theo/metE* in the presence of his target metabolite, theophylline. The results indicate that the riboswitch *theo/metE* used in this study is a potential genetic tool for gene silencing in XAC.

**Key words:** genetic tool, gene expression, Xac, citrus canker.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Cancro cítrico

O cancro cítrico, uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac)(Xanthomonadales/Xanthomonadaceae), tem sido nos últimos tempos uma ameaça real para a citricultura brasileira, bem como mundial, pelas perdas que pode causar e pela dificuldade de controle. O cancro cítrico foi constatado no Brasil em 1957, na cidade de Presidente Prudente, no interior do estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Atualmente, esta doença está espalhada em várias regiões do planeta, e está presente nos dois maiores produtores de laranja do mundo, o Brasil e os Estados Unidos (estado da Flórida) (GOTTWALD et al., 2002). A doença afeta a maioria dos cultivares de citros comerciais, ocorrendo principalmente nas áreas subtropicais do mundo (GOTTWALD et al., 2009).

A infecção das plantas ocorre por aberturas naturais como estômatos ou por lesões/galerias no mesófilo provocadas pela larva do minador dos citros *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariida) (CHAGAS et al., 2001). O espalhamento da doença entre as plantas se dá pela ação dos ventos, sendo agravado pelas chuvas (GOTTWALD et al., 2002). Adicionalmente, pode-se destacar que Xac forma biofilmes que contribuem para sua patogenicidade e sobrevivência epifítica (superfície foliar) necessária durante a infecção (CUBERO et al., 2011; SENA-VÉLEZ et al., 2016).

Os principais sintomas do cancro cítrico são as lesões corticosas nas folhas, frutos e ramos, acompanhadas de formação de halos. Com o agravamento da doença, pode ocorrer queda das folhas e frutos (GOTTWALD et al., 2012), perecimento do galho e declínio da planta em geral (SCHUBERT et al, 2001).

Um controle mais eficaz do cancro foi realizado por uma década (1999-2009) no estado de São Paulo com a erradicação de plantas doentes e das plantas circunvizinhas respeitando-se porcentagem de contaminação (5%). Então, a Resolução SAA n. 43, de 25/06/2009 entrou em vigor, onde era recomendado a erradicação da planta contaminada e de todas as plantas suspeitas em um raio de 30 metros. Através da Resolução n. 147, de 31/10/2013 passou a se adotar o procedimento de erradicação somente das plantas contaminadas, com pulverização de cobre nas plantas suspeitas em um raio de 30 metros. A Instrução Normativa n° 37, publicada no Diário Oficial em 06/09/2016, que passou a vigorar a partir do dia 6 de março/2017, onde os estados que possuem incidência de cancro cítrico podem optar por outras medidas além apenas da erradicação das plantas, como a mitigação que inclui novas estratégias de controle (FUNDECITRUS, 2017). Pela Instrução Normativa n°37 há uma classificação em quatro áreas

quanto a situação em relação à praga: Área com Praga Ausente (estados sem ocorrência de praga), Área Livre de Praga (área específica livre da doença pertencente a um estado onde a doença está presente), Área sob Erradicação ou Supressão (área com distribuição restrita ou com baixa incidência em um estado onde ocorre a doença) e Área sob Sistema de Mitigação de Risco (área com ampla distribuição da doença em um estado em que a doença está presente) onde o Estado de São Paulo se enquadra.

A legislação atual do Cancro Cítrico realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicada no Diário Oficial em 11/05/2018, mantém a classificação em quatro áreas quanto ao status fitossanitário previsto pela Instrução Normativa nº 37. Há mudanças, por exemplo, no Sistema de Mitigação de Risco (SMR), como a permissão de processamento/beneficiamento de frutos produzidos em área de SMR em estado vizinho, e a possibilidade de reconhecimento de propriedades sem cancro cítrico dentro de área de SMR (FUNDECITRUS, 2018), entre outras.

### **1.2 *Xanthomonas citri***

A bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* (SCHAAD et al., 2005), possui forma de bastonete, é delgada, aeróbica, se move através de um único flagelo polar e coloniza plantas cítricas. Esta bactéria é o agente etiológico do cancro cítrico asiático ou cancrose do tipo A, que representa a forma mais generalizada e grave da doença (GOTTWALD et al., 2002). Fora dos tecidos da planta, esta bactéria apresenta uma capacidade bastante limitada de sobrevivência (GOTTWALD et al., 2009), mas pode sobreviver na superfície de folhas e frutos na forma de biofilme (CUBERO et al., 2011; SENA-VÉLEZ et al., 2016).

Xac possui genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002). Apresenta um cromossomo circular de 5,175,554 pb, com 64% de G+C em sua sequência nucleotídica, sendo que 85,59% do tamanho do cromossomo corresponde a região codificadora de proteínas. Em adição, possui dois plasmídeos: pXAC33, que contém 33,699 pb, com 61,9% de GC, e uma região codificadora que corresponde a 81,59% em relação ao seu tamanho, enquanto que o outro plasmídeo, pXAC64, possui quase o dobro de pares de base, com 64,920 pb, contendo 61,4% de GC, e uma região codificadora que equivale a 89,26% de seu tamanho.

### **1.3 Riboswitches e o controle da expressão gênica**

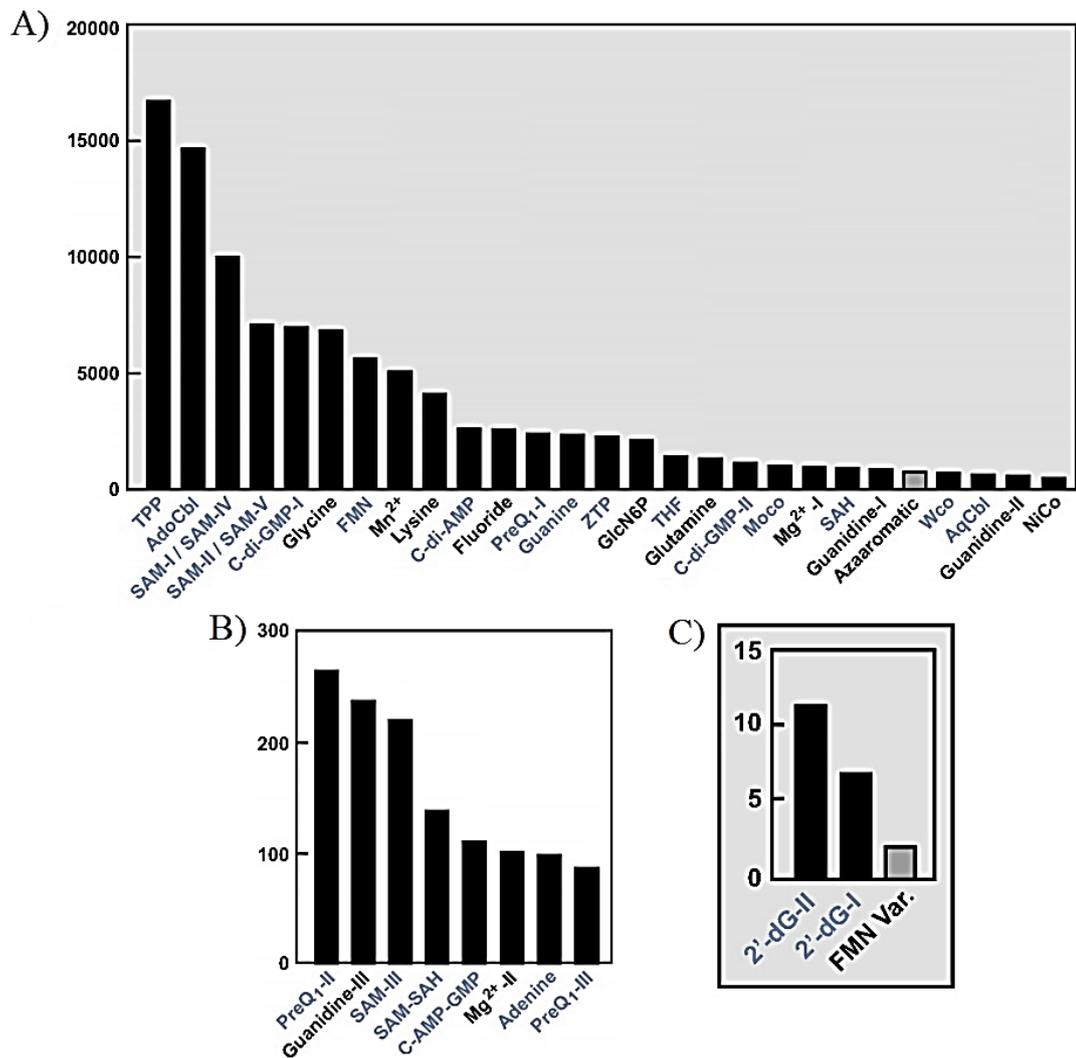
O controle da expressão gênica é um processo complexo que ocorre em todos os organismos, sendo o RNA uma molécula fundamental no processo de expressão. Além de

mensageiro e transportador, o RNA pode atuar como regulador nos processos de transcrição, splicing, estabilidade do mRNA e tradução (CHANG et al., 2012). Em alguns casos, os RNAs não necessitam da ação de outro fator para regular a transcrição e a tradução, como fatores proteicos (NUDLER & MIRONOV, 2004). A estes RNAs que atuam na ausência de um fator auxiliar e que, em resposta a um sinal adquirem uma mudança estrutural, tem sido atribuído o nome de riboswitches (HENKIN, 2008).

No ano de 2002 foram relatados os primeiros riboswitches identificados em bactérias (MIRONOV et al., 2002; WINKLER et al., 2002; NAHVI et al., 2002). Nos dias atuais, são descritas mais de 40 classes distintas de riboswitches (MCCOWN et al., 2017) (Figura 1), onde a classe de riboswitches TPP (Tiamina pirofosfato) é a mais abundante, e a classe de variantes de riboswitches FMN é a menos abundante entre as classes descritas até o momento.

Os riboswitches são classificados de acordo com a arquitetura do seu domínio aptâmero. Quase todos são elementos de regulação *cis*, e em bactérias estão localizados na região 5' não transcrita do mRNA (5'UTR) e reconhecem moléculas pequenas denominadas ligantes (Aghdam et al., 2016), até mesmo tRNAs, mensageiros secundários, íons, vitaminas ou aminoácidos (MACHTEL et al., 2016).

**Figura 1** - Classes de riboswitches (A, B e C): (TPP) Tiamina pirofosfato, (AdoCbl) adenosilcobalamina ou coenzima B<sub>12</sub>, (SAM) S-adenosilmetionina, (C-di-GMP) GMP-di-cíclico, (FMN) flavina mononucleotídeo, (Mn<sup>2+</sup>) manganês divalente, (C-di-AMP) AMP-di-cíclico, (PreQ<sub>1</sub>) Prequeuosina<sub>1</sub>, (ZTP) 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosídeo-5'-trifosfato, (GlcN6P) glucosamina-6-fosfato, (THF) tetraidrofolato, (Moco) cofator molibdênio, (Mg<sup>2+</sup>) magnésio divalente, (SAH) S-adenosilhomocisteína, (Wco) cofator tungstênio, (AqCbl) Aquacobalamina, (NiCo) níquel divalente e cobalto divalente, (2'-dG) 2'-deoxiguanosina, (FMN Var.) variante de riboswitch FMN. Classes em cinza destacam que os ligantes são derivados de nucleotídeos de RNA ou precursores. O gráfico apresenta o número de representantes por classe de riboswitches. Barras em preto indicam classes conhecidas. Barras em cinza indicam classes análogas em relação as classes já conhecidas.



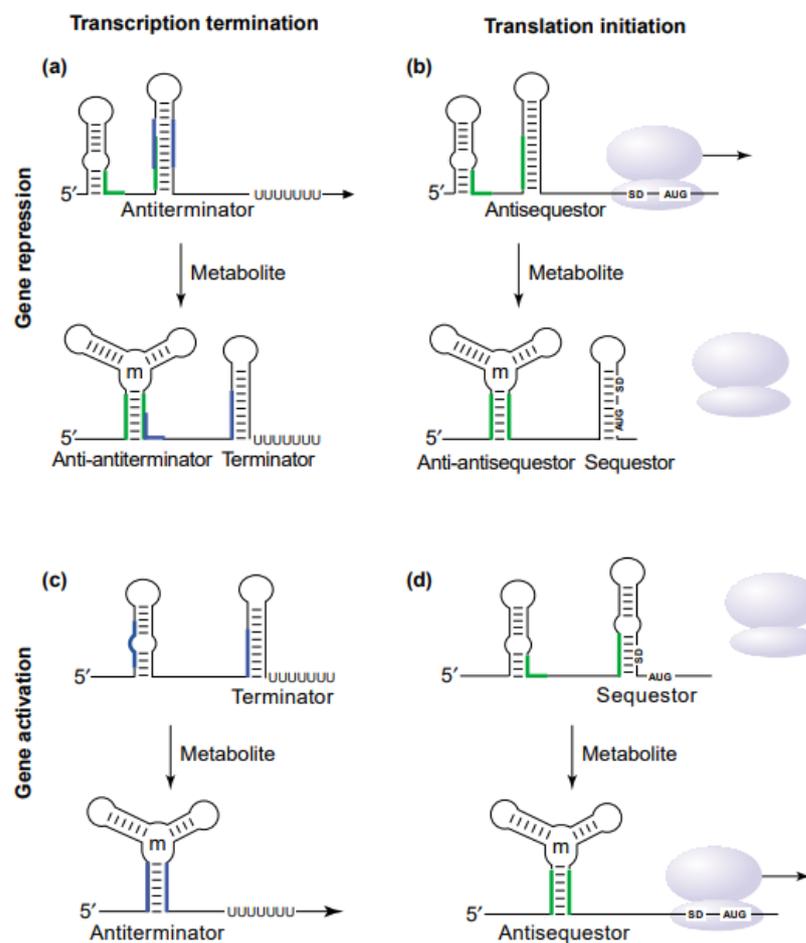
adaptado de MCCOWN et al. (2017)

A estrutura de um riboswitch é constituída por dois domínios: domínio aptâmero, uma espécie de receptor para uma molécula pequena, e a plataforma de expressão, que contém um interruptor secundário e dirige a maquinaria de expressão gênica (CERES et al., 2013). Os riboswitches podem ser de arquitetura não repetitiva ou podem formar estruturas em tandem, como os riboswitches PRPP (fosforibosil pirofosfato) que controlam o metabolismo de purinas em bactérias (SHERLOCK et al., 2018).

Os riboswitches podem induzir o término prematuro da transcrição, inibir o início da tradução e também alteram as taxas de decaimento do mRNA, desde que ligados a pequenas moléculas chamadas de ligantes (LEE & OH, 2015). Na posição ON, quando o domínio aptâmero não está ligado a um metabólito, a plataforma de expressão forma um anti-terminador que permite que a transcrição do mRNA ocorra, enquanto que na posição OFF, o metabólito se liga ao domínio aptâmero, que adquire a forma estável do terminador, fazendo com que a transcrição do mRNA termine. Na tradução ON, o domínio aptâmero não ligado a um

metabólito faz com que a plataforma de expressão permita a ligação do ribossomo em seu local de ligação no mRNA, a região RBS, e na tradução OFF, um metabólito se liga ao domínio aptâmero, causando sequestro do RBS e impedindo que o ribossomo se ligue ao mRNA para realizar a tradução (TUCKER & BREAKER, 2005) (Figura 2).

**Figura 2** - Controle da expressão gênica pela atuação de um riboswitch bacteriano. A: inibição da transcrição (OFF) devido a interação entre o metabólito alvo (m) e o domínio aptâmero. B: inibição da tradução (OFF) pelo sequestro da região Shine-Delgarno (SD) devido a ligação de um metabólito alvo (m) ao domínio aptâmero, impedindo a atuação do ribossomo. C: ativação da transcrição (ON) devido a interação entre metabólito alvo (m) e o domínio aptâmero. D: Ativação da tradução (ON) devido interação entre metabólito alvo (m) e domínio aptâmero. AUG: metionina (Met).



NUDLER & MIRONOV (2004)

Os riboswitches, quando ligados ao seu metabólito alvo, alteram sua própria conformação estrutural, assim podem controlar a expressão de genes downstream (MELLIN & COSSART, 2015), ou seja, controlam a expressão do gene que está a sua frente na sequência do mRNA ao qual ele se encontra.

O riboswitch *theo/metE* utilizado neste estudo é uma quimera que está baseada em CERES et al. (2013), e sua plataforma de expressão *metE* é de *Bacillus subtilis*. O gene *metE*

em *B. subtilis* codificada a enzima *S-adenosilmetionina sintetase* (EC 2.5.1.6), caracterizado por YOCUM et al. (1996). O domínio aptâmero possui a nomenclatura *theo* por reconhecer o metabólito alvo teofilina, e têm sido descrito na literatura como um domínio aptâmero de riboswitches que controlam a tradução (SUESS et al., 2004; SHAWN & GALLIVAN, 2004) e a transcrição (WACHSMUTH et al., 2012), ou ambos (PEDROLLI et al., 2015). A estrutura do riboswitch *theo/metE* está apresentada na figura a seguir (Figura 3).

**Figura 3** - Riboswitch *theo/metE*. Domínio aptâmero *theo* (vermelho) e plataforma de expressão *metE* (verde). Note a estrutura antiterminadora da plataforma de expressão *metE*.

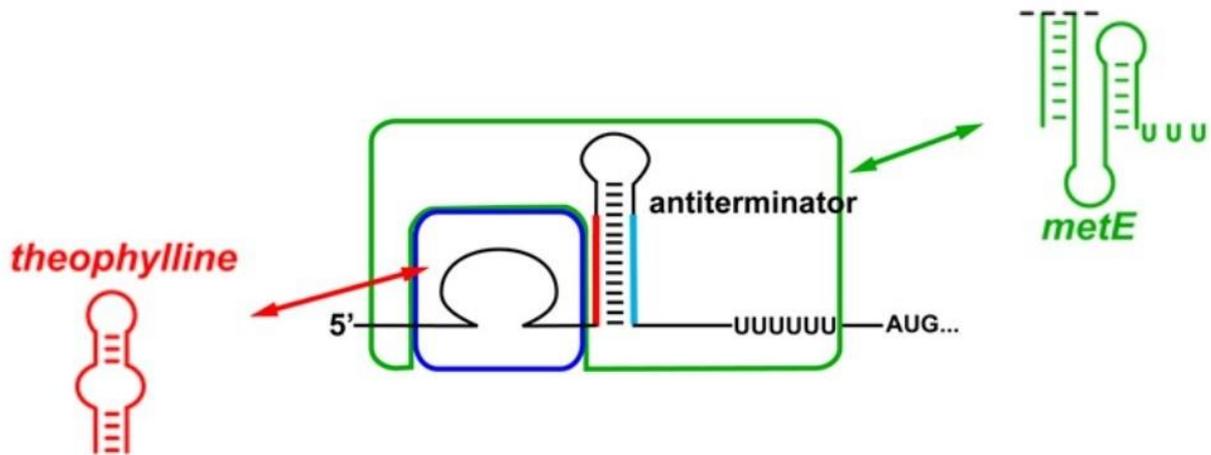


imagem adaptada de CERES et al. (2013)

A plataforma de expressão *metE* possui uma estrutura característica de antiterminador. O domínio aptâmero *theo* reconhece a molécula de teofilina quando presente, e esta interação entre o metabólito alvo e o domínio aptâmero leva a plataforma de expressão *metE* a uma alteração conformacional, tornando-se um terminador de transcrição. Deste modo, qualquer gene que esteja à frente do riboswitch pode ter sua expressão controlada.

Segundo TOPP et al (2010), para muitas bactérias, os métodos simples usados para induzir a expressão gênica de uma maneira dependente de ligante não existem. Por isso, para enriquecer o conhecimento atual sobre controle da expressão gênica e compreender melhor o funcionamento de alguns genes essenciais ou não, em uma ampla gama de bactérias, tem sido desenvolvido moléculas artificiais de RNA, os riboswitches sintéticos. Os riboswitches têm

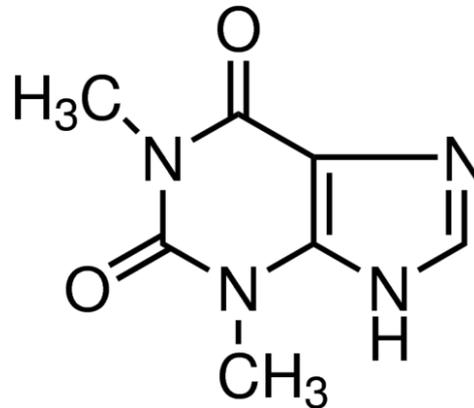
sido utilizados nos últimos anos em estudos envolvendo o controle da expressão gênica em diversas espécies de bactérias, Arquea e vírus (BERENS & SUESS, 2015).

Estudos genéticos em qualquer organismo requerem ferramentas eficazes para se alterar a expressão gênica. Dentre estas, os riboswitches podem oferecer uma alternativa bastante atrativa para a modulação da expressão de genes de interesse. Como visto acima, riboswitches permitem ligar ou desligar a expressão de genes sem a remoção dos mesmos dos genomas. Esta peculiaridade dos riboswitches possibilita o estudo direto de um gene e a avaliação da sua falta (quando desligado ou “OFF”), bem como permite o reestabelecimento do estado selvagem sem a necessidade da complementação padrão (estado “ON”).

#### 1.4 Teofilina

A teofilina (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) (Figura 4) ou 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona (IUPAC). Segundo o PubChem (Kim et al., 2016), a teofilina é uma substância utilizada neste estudo como metabólito alvo para o *riboswitch theo/metE* - é um derivado de xantina, um composto isolado das plantas *Camellia sinensis* e *Coffea arabica*. A teofilina possui uma massa molecular equivalente a 180.167 g/mol. Apresenta atividade broncodilatadora, portanto, é uma substância utilizada no tratamento de doenças relacionadas à respiração, como asma e brocoespasmo, sendo considerada um agente antiasmático.

Em temperatura ambiente, a teofilina é um sólido cristalino que apresenta coloração branca. Naturalmente, a teofilina é uma substância encontrada em chá verde e chá preto. Quimicamente, é similar a cafeína e a teobromina. Teofilina, cafeína e teobromina são substâncias consideradas alcaloides, portanto, apresentam vários átomos de nitrogênio em sua composição. Alguns riboswitches são conhecidos por ter a teofilina como metabólito alvo (SUESS et al., 2004; DESAI & GALLIVAN, 2004; WACHAMUTH et al., 2012, CERES et al., 2013; BORUJENI et al., 2016), assim como o riboswitch sintético *theo/metE* utilizado neste estudo.

**Figura 4** - Fórmula estrutural da teofilina.

(SIGMA)

### 1.5 *parB* e $\alpha$ -amilase de *Xanthomonas citri*

Os mecanismos de funcionamento do sistema de segregação cromossômica bacteriana ParA-ParB-*parS* foram relatados em *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae* e *Caulobacter crescentus* (LEONARD et al., 2005; FOGEL & WALDOR., 2006; MURRAY et al., 2006; PTACIN et al., 2010). De forma geral, ParA direciona o centrômero bacteriano durante a segregação interagindo com ParB ligado a *parS*. ParA atua como switch molecular presente nas células em duas formas: ligada a ATP, forma filamentos, ancorados nos polos celulares para onde o centrômero deve seguir, e interage com DNA inespecificamente. Ao contatar ParB-*parS* (região centromérica) ocorre hidrólise de ATP, ParA-ADP se dissocia do filamento, que encurta e opera no posicionamento do centrômero na direção dos pólos celulares e para longe do meio das células, onde a divisão deve ocorrer (HWANG et al., 2013; VECCHIARELLI et al., 2013; LIM et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa descreveu a existência do sistema ParA-ParB-*parS* em *Xac* (UCCI et al., 2014) e ainda, pôde constatar que *parB* não é um gene essencial para *Xac*, e mesmo quando deletado do genoma, a bactéria continua a causar a doença em citrus, apesar da deleção de *parB* resultar em um fenótipo de aumento de tamanho celular (LACERDA et al., 2017).

A enzima  $\alpha$ -amilase é amplamente distribuída e caracterizada em diversos organismos. Em *Xanthomonas citri*, um estudo demonstrou que esta enzima não é essencial para seu desenvolvimento em placa e não apresenta uma função chave na infecção desta bactéria em citros (Martins et al., 2010). Porém, é importante destacar que para estudos em biologia molecular envolvendo *Xanthomonas citri*, a utilização do gene  $\alpha$ -amilase é de rápida caracterização por testes qualitativos e quantitativos.

## 1.6 Hipótese

É possível desligar a expressão de ORFs/genes de interesse em *Xanthomonas citri* utilizando riboswitches sintético que inibem a transcrição gênica.

## 1.7 Objetivo geral

Construção de uma plataforma de expressão (riboswitch) que possa ser utilizada no controle de transcrição em *Xac*.

# MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 Linhagem bacteriana e cultivo

A linhagem *Xac* 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) que foi utilizada no presente estudo foi a sequenciada por SILVA et al. (2002). *Xac* foi cultivada a 30° C em meio de cultivo NYG com ou sem ágar (peptona 5 g/L, extrato de levedura 3 g/L e 20ml de glicerol).

## 2.2 Biologia Molecular

Os procedimentos em biologia molecular seguiram SAMBROOK et al. (1989). As extrações de DNA plasmidial foram realizadas com o Gene Jet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). As restrições enzimáticas foram realizadas a 37°C por 1 hora sob condições do fabricante das enzimas (Thermo Scientific), seguindo recomendações de temperaturas de inativação específicas para cada enzima. Os procedimentos de purificação de isolados de gel de agarose e também as purificações de produtos de PCR foram elaboradas através do GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). A reação de ligação dos genes *parA* (coordenada 4590971..4591768), *parB* (coordenada 4591768..4592694), sequência upstream *amy* (c949424..948665) e o gene de  $\alpha$ -amilase (c948662..947690) ao vetor comercial pJET seguiu o protocolo do CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas-Thermo Scientific). As extrações de RNA foram elaboradas com o RNA Plus Mini Kit (QIAGEN), seguindo recomendações do fabricante, e previamente, as culturas de bactérias como material para extração de RNA foram submetidas ao RNA Protect (QIAGEN) antes do início das extrações. O RT-PCR para seguirmos a expressão do gene teste *parB* foi realizado com o Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (QIAGEN). Para a amplificação da região codificadora *parB* a partir do

cDNA utilizamos os primers específicos parBRTF/parBRTR desenhados pelo grupo (Tabela 1).

Sequências foram obtidas por PCR a partir do DNA genômico de Xac utilizando-se *Pfu* DNA polimerase e seguindo as recomendações do fabricante (Fermentas/Thermo Scientific), através de ciclos touchdown com varredura de temperatura de 68°C a 60°C. Os géis de eletroforese foram preparados na concentração de 0,7% agarose em TBE1X. Os marcadores de peso molecular para uso em eletroforese em gel de agarose foram GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) e 1kb DNA Ladder (New England BioLabs). Sequenciamentos de DNA foram realizados pela empresa Macrogen (Korea) e também pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) – UNESP *campus* Jaboticabal. Indução de repressão do riboswitch foi realizada adicionando-se Teofilina (SIGMA) nas culturas bacterianas (CERES et al., 2013), preparada previamente em água fervente para uma concentração final de 46mM, sendo esterilizada com filtro 0,22 µm.

Transformação de *Escherichia coli* linhagem DH10Bs seguiu SEIDMAN et al. (1997). Transformação de Xac por eletroporação seguiu FERREIRA et al. (1995).

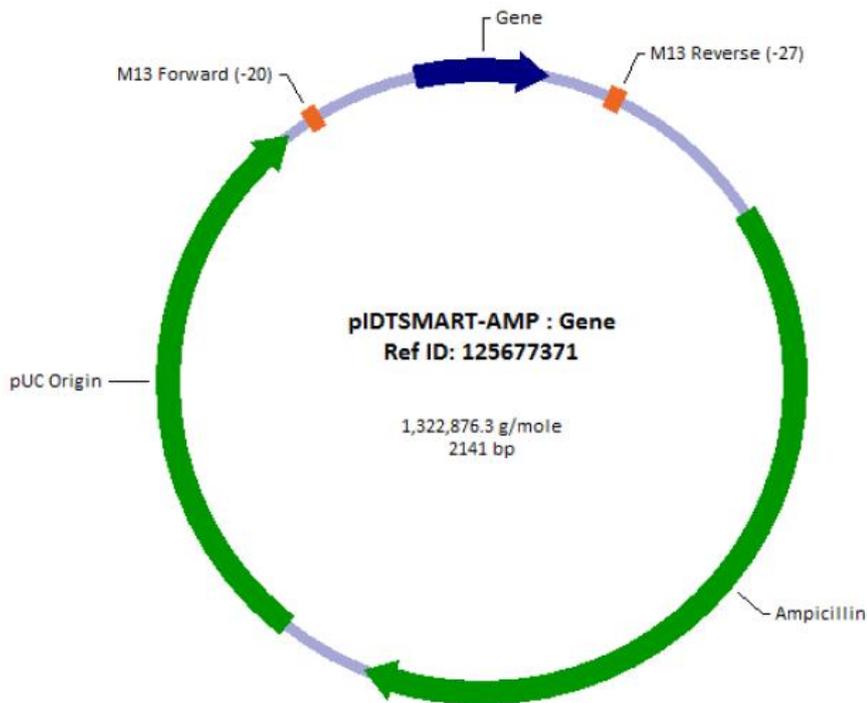
### 2.3 Construção de vetores de clonagem

O riboswitch *theo/metE* utilizado no presente estudo foi sintetizado pela empresa IDT, presente no vetor pIDTSMART-AMP:Gene na forma de cDNA (Figura 5). A plataforma de expressão quimérica *theo/metE* foi baseada em CERES et al. (2013), e sua sequência está descrita a seguir:

*sítio de restrição (XbaI)-*

CAAAAAATTAATAACATTTTCTCTTATAACCAGCTTCGAAAGAAGCCCTTGGCAGG  
AGAGAGGCAGTGTTTTACGTAGAAAAGCCTCTTTCTCTCATGGGAAAGAGGCTTT  
TTGTTGT (riboswitch)- **AGGAGG**TTATT (RBS) – sítio de restrição (*NdeI*)– gene a ser  
caracterizado (*parB* ou  $\alpha$ -amilase).

**Figura 5** - Mapa do vetor pIDTSMART-AMP:Gene (IDT). A seta azul indica a posição do riboswitch *theo/metE* (dsDNA). Seu tamanho é de 2341 pb. O vetor possui marca de resistência à ampicilina.



(IDT)

O riboswitch foi ligado a 5' dos genes *parB* e  $\alpha$ -amilase para testes de inibição de transcrição utilizando-se as estratégias a seguir:

- 1) Construção *parA-theo/metE-parB* (sendo *parA*, ORF3905, coordenada genômica 4590971..4591768, e *parB* ORF3906, coordenada 4591768..4592694). Os amplicons correspondentes aos fragmentos de DNA correspondentes a *parA* e *parB* foram amplificados por PCR utilizando-se os pares de primers 201409parAF/201409parAR e 201409parBF/20140220parBR, respectivamente, (Tabela 1) e enzima *Pfu*. Para a montagem da sequência *parA-theo/metE-parB* os produtos de PCR *parA* e *parB* foram digeridos com as enzimas *BamHI/XbaI* e *NdeI/HindIII*, respectivamente; o riboswitch foi extraído do vetor pIDTSMART-AMP:gene com as enzimas *XbaI/NdeI*; o vetor suicida pNPTS138 (cedido por Prof. Lucy Shapiro, University of Stanford, USA) foi linearizado com as enzimas *BamHI/HindIII*. Finalmente, *parA* (*BamHI/XbaI*), riboswitch (*XbaI/NdeI*) e *parB* (*NdeI/HindIII*) foram ligados ao vetor pNPTS (*BamHI/HindIII*), dando origem ao vetor pDB1 (Figura 6 e Tabela 2). O pDB1 foi checado por perfil de restrição (Figura 7) e sequenciamento de DNA.
- 2) Construção do sistema upstream *amy-theo/metE- $\alpha$ -amilase* (sequência upstream ao gene  $\alpha$ -amilase: coordenada genômica c949424..948665, e gene  $\alpha$ -amilase: coordenada c948662..947690). Os amplicons correspondentes a sequência upstream ao gene  $\alpha$ -

*amilase* e o próprio gene  $\alpha$ -*amilase* foram amplificados por PCR utilizando-se os pares de primers Amy up F *EcoRI*/Amy up R *XbaI* e Amy down F *NdeI*/Amy down R *HindIII*, respectivamente (Tabela 1) e enzima *Pfu*. Para a montagem da sequência upstream *amy-theo/metE- $\alpha$ -amilase* os produtos de PCR upstream *amy* e gene de  $\alpha$ -*amilase* foram digeridos com as enzimas *EcoRI/XbaI* e *NdeI/HindIII*, respectivamente. O riboswitch foi amplificado inicialmente através do vetor pIDTSMART-AMP:gene com os primers M13F/M13R (Invitrogen) (Tabela1), e o produto de PCR purificado foi posteriormente digerido com enzimas *XbaI/NdeI*; o vetor suicida pNPTS138 foi linearizado com as enzimas *EcoRI/HindIII*; upstream *amy* (*EcoRI/XbaI*), riboswitch (*XbaI/NdeI*) e  $\alpha$ -*amilase* (*NdeI/HindIII*) foram ligados ao vetor pNPTS (*EcoRI/HindIII*), dando origem ao vetor pDB2 (Figura 6 e Tabela 2). O pDB2 foi checado por perfil de restrição (Figura 8) e sequenciamento de DNA.

**Tabela 1** - Primers.

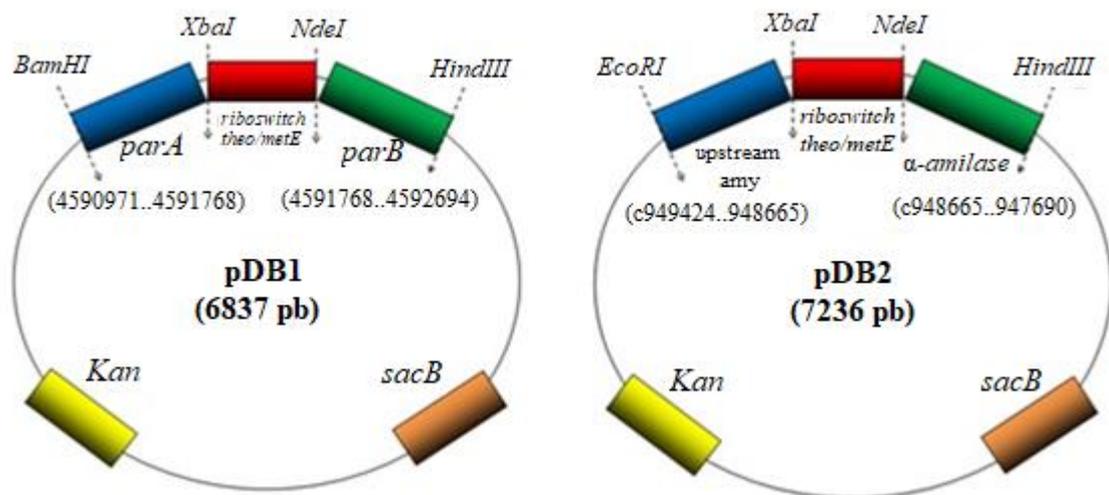
PRIMERS (50 $\mu$ M)	SEQUÊNCIA
201409 parAF	5' AAGGATCCATCGCCATTGCCAACCAGAAG
201409 parAR	5' TGTCTAGATTAGACGGTCTCCACGGGCC
201409 parBF	5' TTCATATGAACAAGCCGATCCCCGCAAAG
20140220 parBR	5' AAAAAGCTTTTAGCTACGCTGCATGCGCAGGC
Riboswitch F	5' AGAAGCCCTTGGCAGTGAGAG
Riboswitch R	5' CTCTCACTGCCAAGGGCTTC
Amy up F <i>EcoRI</i>	5' AAGAATTCTTGGCATGGCGCTGTTTGACCTG
Amy up R <i>XbaI</i>	5' TGTCTAGACGGATCGATCTCCAGTGGTAAGCG
Amy down F <i>NdeI</i>	5' TTCATATGCGCAACACGCCTGCTCATGCTC
Amy down R <i>HindIII</i>	5' TTAAGCTTCACTGCAAAGGTCACGGCGCGATTG
parBRTF	5' GGGCGTGATCCAGCCGATC
parBRTR	5' CAACACGCGAATGGCCACTG
M13 F	5' GTAAAACGACGGCCAG
M13 R	5' CAGGAAACAGCTATGAC

parBRTF (qPCR)	5' GGGCGTGATCCAGCCGATC
parBRTR (qPCR)	5' AGCCCAGCCAGCTGCGAAG
amyF (qPCR)	5' ACCATCTCAATCGCGTCTTC
amyR (qPCR)	5' CCAGGAAGTGGTCGTAATCG

**Tabela 2** - Vetores de clonagem.

Vetor	Informações
pDB1	Vetor de 6837 pb contendo sequência <i>parA-theo/metE-parB</i> ligado ao vetor pNPTS138. Canamicina como marca de resistência.
pDB2	Vetor de 7225 pb contendo sequência upstream <i>amy-theo/metE-<math>\alpha</math>-amilase</i> ligado ao vetor pNPTS138. Canamicina como marca de resistência.

**Figura 6** - Modelo teórico das construções finais dos vetores de clonagem contendo o riboswitch à 5' dos genes *parB* e  $\alpha$ -amilase. Na esquerda temos o pDB1, na direita temos o pDB2. Os vetores possuem marca de resistência ao antibiótico canamicina e também possuem o gene *sacB* que codifica a enzima levansucrase. A figura evidencia os sítios de restrição das enzimas utilizadas para a digestão de cada um dos componentes necessários para a construção dos vetores pDB1 e pDB2 por reação de ligação.



**Figura 7** - Perfil de restrição. A: Perfil de restrição enzimática de transformantes pDB1: 1,4 e 8- DNA plasmidial de diferentes transformantes pDB1 digeridos com *BamHI/HindIII* (5362 pb e 1475 pb), 2, 5 e 9- suas digestões com *NdeI* (vetor linearizado de 6837 pb) e 3, 6 e 10-

digestões com *XbaI* (duas bandas diagnóstico entre 3500 e 4000 pb); 7- vetor pNPTS (5383 pb - controle). A (\*) e B: Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

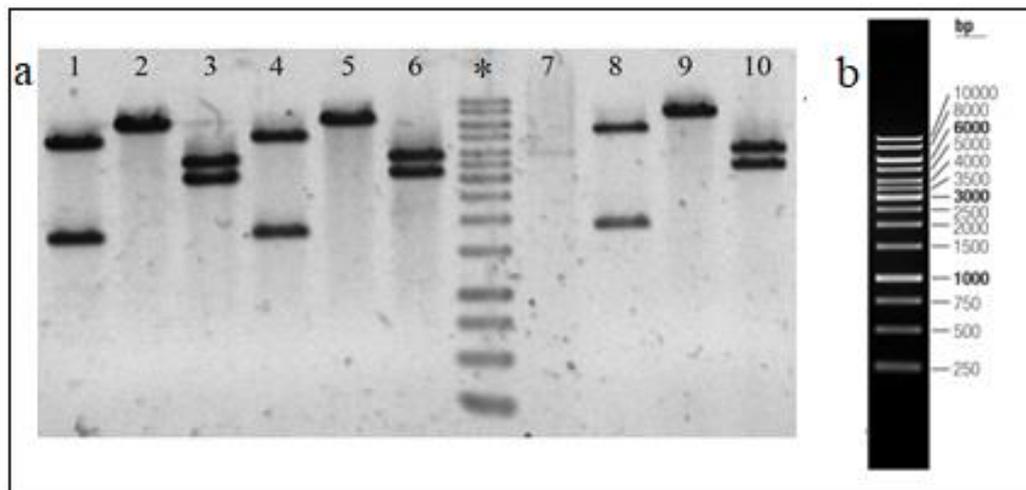


imagem de gel de eletroforese adquirida com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

**Figura 8** – Perfil de restrição. A: Perfil de restrição enzimática de transformantes pDB2: 1, 6 e 11- DNA plasmidial de transformantes pDB2 (7225 pb - controle), em 2,7 e 12- digestão com *HindIII* (bandas diagnóstico em 5000 pb e entre 1500-2000 pb), em 3, 8 e 13: digestão com *XbaI* e 4, 9 e 14: digestão com *DraIII* (em ambos há bandas diagnóstico entre 3000-4000 pb), e por fim, em 5, 10 e 15: digestão com *PstI* (vetor linearizado de 7236 pb), respectivamente. A(\*) e B: DNA 1kb Ladder (NEB).

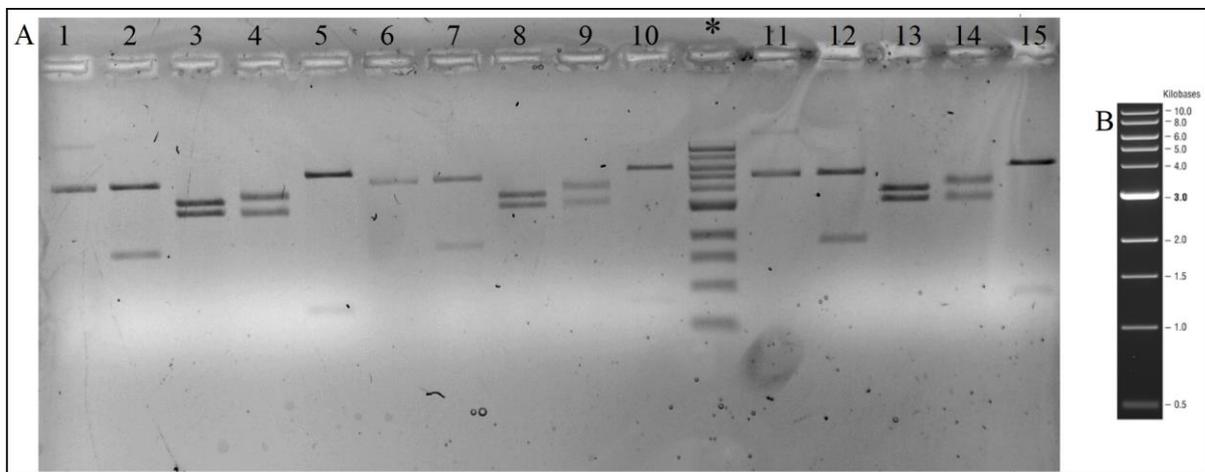


imagem de gel de eletroforese adquirida com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

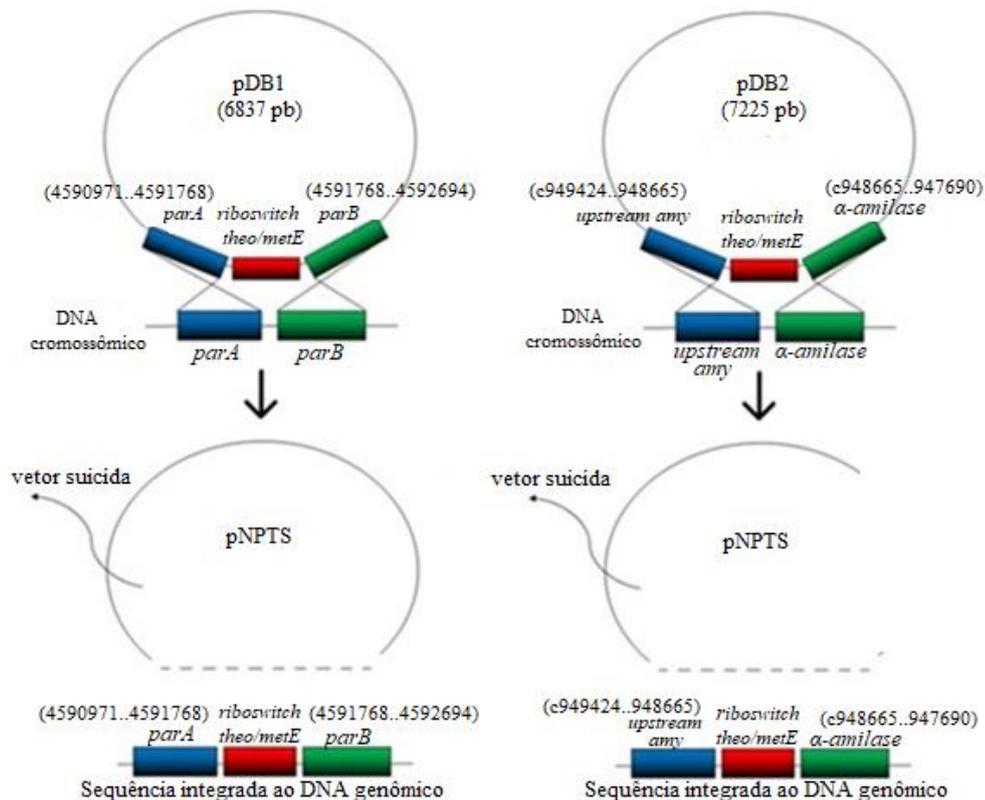
#### 2.4 Construção das linhagens Xac

As linhagens Xac pDB1 e Xac pDB2 contendo *theo/metE* a 5' dos genes *parB* e  $\alpha$ -amilase, respectivamente, foram obtidas mediante transformação do vetor suicida pNPTS138 em Xac, onde a integração por troca alélica promove a entrada de *theo-metE* a frente dos genes *parB* e  $\alpha$ -amilase, alterando-se o genoma da bactéria selvagem. O procedimento de

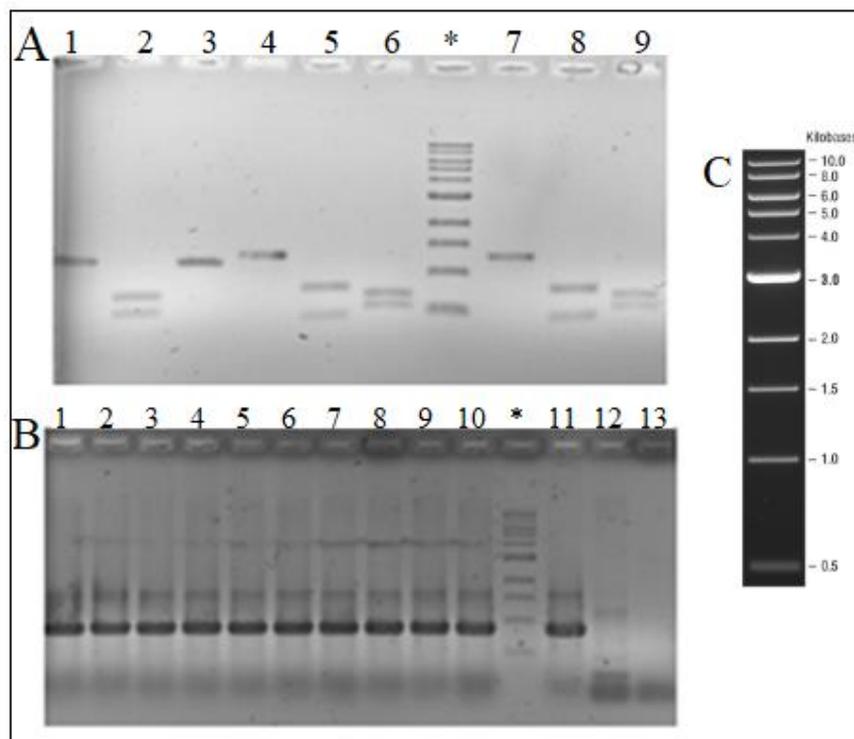
recombinação homóloga em questão foi descrito em LACERDA et al. (2017). A seleção dos mutantes Xac pDB1 e Xac pDB2 (Figura 9) ocorreram em meio NYG/ampicilina (20 µg/mL)/3% sacarose, seguindo o critério de que o gene *sacB* codifica a enzima *levansucrase*, que é letal para a bactéria quando na presença de sacarose. Esta metodologia visa eliminar a possibilidade de seleção de mutantes falso positivos.

Após o processo de obtenção das linhagens Xac pDB1 e pDB2, foi elaborado um perfil de restrição da linhagem Xac pDB1 com as enzimas *DraIII*, *XbaI*, *HindIII* e *PstI* (Thermo Scientific) (Figura 10a), tendo como molde o produto de PCR *parA*-*theo/metE*-*parB* sequenciado e amplificado previamente com *Pfu* (primers *parARTF/parBRTR*) através do DNA cromossômico da linhagem Xac pDB1. Em seguida, a linhagem Xac pDB2 foi averiguada pelo PCR da região upstream *amy*-*theo/metE* amplificada com *Pfu* (primers *Amy Up F EcorI*, *RiboswitchR*)(Figura 10b) tendo o DNA cromossômico desta linhagem como molde, e adicionalmente, foi realizada uma verificação em placa com meio NYG/ampicilina (20µg/mL)/0,2% amido para evidenciar a degradação de amido, apesar de sua condição de mutante (note nas Figuras 17a e 18a). Confirmamos assim a obtenção das linhagens Xac pDB1 e pDB2 essenciais para a realização deste estudo.

**Figura 9** - Modelo do processo de troca alélica para obtenção dos mutantes Xac pDB1 e Xac pDB2.



**Figura 10** – Perfil de restrição enzimática e PCR. A: restrição enzimática do produto de PCR *parA-theo/metE-parB* da linhagem Xac pDB1: 1- Produto de PCR *parA-parB* de Xac selvagem (1338 pb), 2- digestão deste produto de PCR com *DraIII* (bandas diagnóstico entre 500-1000 pb) e em 3- não ocorre digestão do produto *parA-parB* com a enzima *NdeI* (controle); 4- produto de PCR *parA-theo/metE-parB* amplificado a partir do DNA plasmidial de transformante pDB1 sequenciado (banda diagnóstico de 1475 pb), 5- digestão do vetor com enzima *DraIII* e 6- com enzima *NdeI* (ambas as digestões com bandas diagnóstico entre 500-1000 pb - controle positivo); 7- produto de PCR *parA-theo/metE-parB* do mutante Xac pDB1 (1475 pb), 8- produto de PCR *parA-theo/metE-parB* do mutante Xac pDB1 digerido com *DraIII* e 9- digerido com *NdeI* (bandas entre 500-1000 pb – idêntico ao diagnóstico de pDB1 sequenciado). B: Produto de PCR da sequência upstream *amy-theo/metE* da linhagem Xac pDB2: 1 a 10 são ampliações por PCR com os primers Amy Up F *EcoRI*/Riboswitch R dos mutantes Xac pDB2 (banda de 829 pb); 11- produto de PCR upstream *amy-theo/metE* tendo como molde o vetor pDB2 sequenciado (banda diagnóstico de 829 pb - controle positivo); 12- DNA cromossômico de Xac selvagem (controle negativo-não possui *theo/metE*) e 13- Reação de PCR livre de qualquer DNA (indicando que não há contaminação nas reações). A (\*), B (\*) e C: DNA 1kb Ladder (NEB).



imagens de gel de eletroforese adquiridas com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

**Tabela 3** – Genótipo das linhagens Xac pDB1 e Xac pDB2.

LINHAGEM	DESCRIÇÃO

Xac pDB1	Possui o riboswitch <i>theo/metE</i> entre os genes <i>parA</i> (coordenada genômica 4590971..4591768) e <i>parB</i> (coordenada 4591768..4592694). Portanto, o riboswitch <i>theo/metE</i> está localizado nesta linhagem entre a coordenada final de <i>parA</i> e coordenada inicial de <i>parB</i> . A linhagem é resistente ao antibiótico ampicilina.
Xac pDB2	Possui o riboswitch <i>theo/metE</i> entre a sequência <i>upstream amy</i> (coordenada genômica c949424..948665) e o gene $\alpha$ -amilase (coordenada c948662..947690). Portanto, o riboswitch <i>theo/metE</i> está localizado nesta linhagem entre a coordenada final da sequência <i>upstream amy</i> e coordenada inicial do gene $\alpha$ -amilase. A linhagem é resistente ao antibiótico ampicilina.

## 2.5 Curvas de crescimento e análises estatísticas

As curvas de crescimento foram realizadas em microplacas de 24wells com auxílio do leitor de absorvância Synergy Microplate Reader (BioTek). A leitura, as condições de crescimento e o processamento dos dados foram elaborados com o software Gen5 2.06 (BioTek). A microplaca foi submetida a uma agitação automática sob temperatura de 30°C, e as leituras de absorvância foram programadas a cada 30 minutos em um período de 24 horas. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa Graphpad Prism v. 6.

## 2.6 REMA e MBC

A Xac selvagem foi reativada em meio NYG sólido e após 24 horas a 30°C, a bactéria reativada foi submetida a um inóculo em meio NYG líquido por mais 24 horas a 30°C com agitação de 200rpm. Em uma microplaca de 24 wells foram adicionados 90  $\mu$ l de meio NYG líquido nos poços do controle negativo (CN – Xac em meio NYG sem antibiótico) e nos poços com a solução teste. Para o controle positivo (CP) e o controle de veículo (CV) são aplicados 100  $\mu$ l das soluções de CP (999  $\mu$ l de meio + 1  $\mu$ l de Canamicina (20  $\mu$ g/mL) e de CV (495  $\mu$ l

de meio + 5 µl de DMSO), respectivamente. Na fileira A são adicionados 200 µl da solução teste. Preparamos uma microdiluição da solução teste, neste caso Teofilina (SIGMA), transferindo horizontalmente 100 µl na microplaca da fileira A para B, de B para C, assim sucessivamente, sempre homogeneizando. Aplicamos 10 µl do inóculo de Xac estando em D.O. 600nm 0,8 em toda a placa, totalizando um volume final de 100 µl em cada poço, com exceção a CP e CV que possuirão 110 µl.

A microplaca foi embalada em plástico filme e as culturas foram incubadas a 30°C overnight. Após a incubação, adicionamos 15 µl de resazurina (1mg em 10ml de água destilada estéril) em todos os poços e a microplaca foi incubada por 1 hora a 30°C. A leitura e o processamento dos dados foram elaborados com o software Gen5 2.06 (BioTek). No REMA, a coloração azul indica morte celular, enquanto que a coloração rosa indica viabilidade celular. Para o MCB, utilizamos um carimbo para transferir as amostras da microplaca para uma placa de cultivo com meio NYG e incubamos a 30°C por 48 horas.

## 2.7 qRT-PCR

Para os testes de qRT-PCR elaborados neste estudo, utilizou-se o StepOne RealTime PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA), com a seguinte condição de amplificação: 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto. Para as reações de amplificação, utilizou-se o SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas). Os genes *gyrB* (DNA girase subunidade β), *atpD* (ATP sintase subunidade β) e *rpoB* (RNA polimerase subunidade β) de *Xanthomonas citri* foram avaliados por serem descritos como genes normalizadores em estudos envolvendo qPCR e Xac (JACOB et al., 2011). Os primers do gene *rpoB* apresentaram melhor eficiência na amplificação, e assim, *rpoB* foi definido como gene normalizador para este estudo. Os primers para amplificação de parte dos genes *rpoB*, *parB* e o gene *α-amilase* utilizados neste estudo para qPCR estão descritos na Tabela 1.

Os dados de qPCR foram obtidos pelo software Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument. As curvas de calibração, assim como todas as etapas de qPCR seguiram os padrões para publicação descritos na literatura (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; BUSTIN et al. 2009; TAYLOR et al. 2010). O resultado das curvas de calibração para os primers de *rpoB*, *parB* e *α-amilase* estão resumidos na tabela a seguir, onde a eficiência dos primers encontram-se nos padrões aceitáveis para publicação (80% a 110%).

**Tabela 4** – Resumo dos resultados das curvas de calibração dos primers de qPCR deste estudo.

Primers	Slope	Y-intercept	R <sup>2</sup>	Efficiency (%)
<i>rpoB</i>	-3.607	23.286	0.712	89.352
<i>parB</i>	-3.092	27.852	0.777	110.594
<i>α-amilase</i>	-3.554	24.451	0.992	91.160

Cultivou-se em triplicatas Xac pDB1 e Xac pDB2 a 30°C sob agitação de 200 rpm em meio NYG. Para todas as coletas de amostra realizadas, converteu-se 400ng de RNA extraído e tratado com DNaseI (Thermo Scientific) para cDNA em um volume final de 30 µl. Todos os cDNAs foram diluídos em água na proporção 1:10 para realização dos testes. Este procedimento contou com a colaboração da Prof<sup>a</sup> Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes (Depto. Biologia, IB, UNESP, Rio Claro).

## 2.8 Determinação da atividade de *α-amilase*

Para se determinar a atividade de *α-amilase* da linhagem Xac pDB2, utilizou-se o método de determinação de açúcares redutores com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), seguindo o método para se obter a concentração de *α-amilase* em U/ml, descrito por OLIVEIRA et al. (2015). A curva de calibração foi elaborada com uma solução padrão de glicose 0/1%. O estudo contou com a colaboração da Prof<sup>a</sup> Dra. Daniela Alonso Bocchini (Instituto de Química, UNESP/Araraquara).

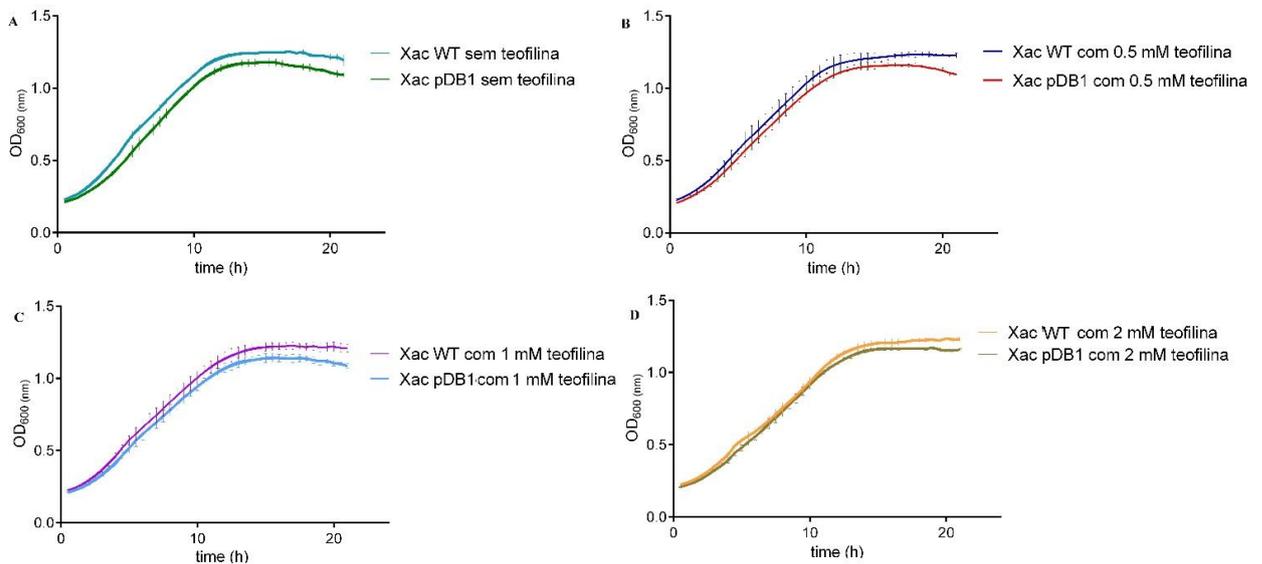
Neste procedimento, cultivou-se a bactéria selvagem e também a linhagem Xac pDB2 em meio NYG com 0,2% de amido, a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por um período de 72 horas. A cada 12 horas, as culturas foram diluídas para DO 600nm 0,1. As culturas foram submetidas à ausência e presença de teofilina na concentração de 2mM. As coletas para determinação da atividade de *α-amilase* foram realizadas nos períodos de 12 horas, 36 horas e 72 horas de crescimento. Em seguida, 12,5ml do extrato enzimático livre de células foi concentrado por centrifugação a 2000xg por 1 hora em filtro Ultracel 10K (Millipore). O volume final de cada extrato enzimático concentrado foi ajustado para 1,5ml. O procedimento foi realizado em replicata biológica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Curvas de crescimento de Xac pDB1 e Xac pDB2

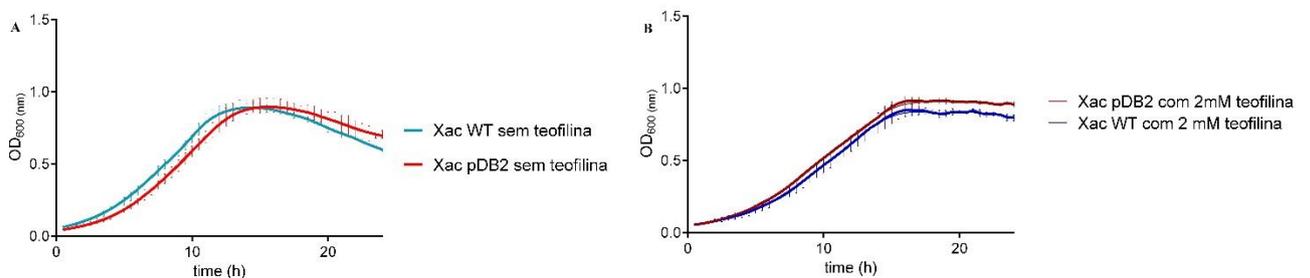
Iniciamos as análises deste estudo através de curvas de crescimento para detectarmos o padrão de crescimento das linhagens Xac pDB1 (Figura 11) e Xac pDB2 (Figura 12) na ausência e na presença de teofilina em triplicata. Nosso objetivo foi avaliar se as linhagens apresentariam comportamento semelhante ao de Xac selvagem com o intuito de utilizá-los nos testes de silenciamento de *parB* e  $\alpha$ -amilase, e demonstrar que as alterações genéticas realizadas para a obtenção das linhagens Xac pDB1 e Xac pDB2 não levaram estas linhagens a morte.

**Figura 11.** Curva de crescimento: Xac WT e Xac pDB1 com e sem teofilina.



gráficos elaborados com Graphpad Prism 6

**Figura 12 –** Curva de crescimento: Xaw WT e Xac pDB2 com e sem teofilina.



gráficos elaborados com Graphpad Prism 6

Após observarmos a viabilidade das linhagens Xac pDB1 e Xac pDB2 nas condições de ausência e presença de teofilina, iniciou-se o ensaio para definir a dose mínima de teofilina que seria utilizada para os ensaios qualitativos e quantitativos deste estudo.

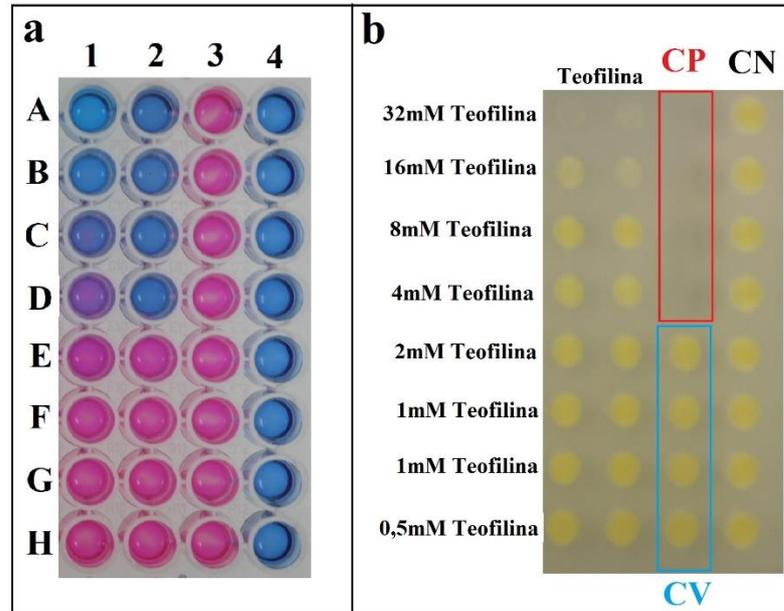
### 3.2 REMA e MBC

Nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM de teofilina as culturas de Xac possuem viabilidade celular, havendo baixa porcentagem de morte apenas na presença de 4mM de teofilina. A partir de 8 mM de teofilina (39,46% de morte celular) a porcentagem de morte celular aumenta consideravelmente conforme aumentamos a dose de teofilina (Tabela 5). Estas observações são indicadas pelo gradiente de coloração azul observada na microplaca (Figura 13a), e pelo crescimento celular em placa (Figura 13b).

**Tabela 5** - Dosagem teofilina como solução teste no REMA e respectiva porcentagem de morte celular. De 8mM de teofilina a 32mM de teofilina a porcentagem de morte celular aumenta consideravelmente. Note que em 4mM de teofilina a porcentagem de células mortas ainda é baixo.

Teofilina	
Concentração (mM)	% Células Mortas
32	98,21
16	86,31
8	39,46
4	14,42
2	0,00
1	0,00
1	0,00
0	0,00

**Figura 13** - REMA (a) e MBC (b). No item a, temos que as colunas 1 e 2 são as culturas de Xac sob diferentes concentrações de teofilina: A- 32mM, B- 16mM, C- 8mM, D- 4mM, E- 2mM, F e G- 1mM e H- 0,5mM. Na coluna 3, da fileira A até D temos o controle positivo (CP) e de E até H o controle de veículo (CV). Na coluna 4 temos o controle negativo (CN). No item B, temos o experimento de MBC onde podemos visualizar o crescimento celular de Xac em diferentes concentrações de teofilina, e adicionalmente, observamos CP destacado em vermelho (controle positivo), CV em destacado azul claro (controle de veículo) e CN (controle negativo), nos quais não há aplicação de teofilina.



imagens adquiridas com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

Podemos concluir que até a concentração de 4 mM foi aceitável realizarmos os testes de inibição da transcrição de *parB* e *amy* nas linhagens Xac desenvolvidas neste estudo, pois não há morte celular ou a porcentagem de morte é baixa como em 4 mM de teofilina, garantindo a confiabilidade dos experimentos.

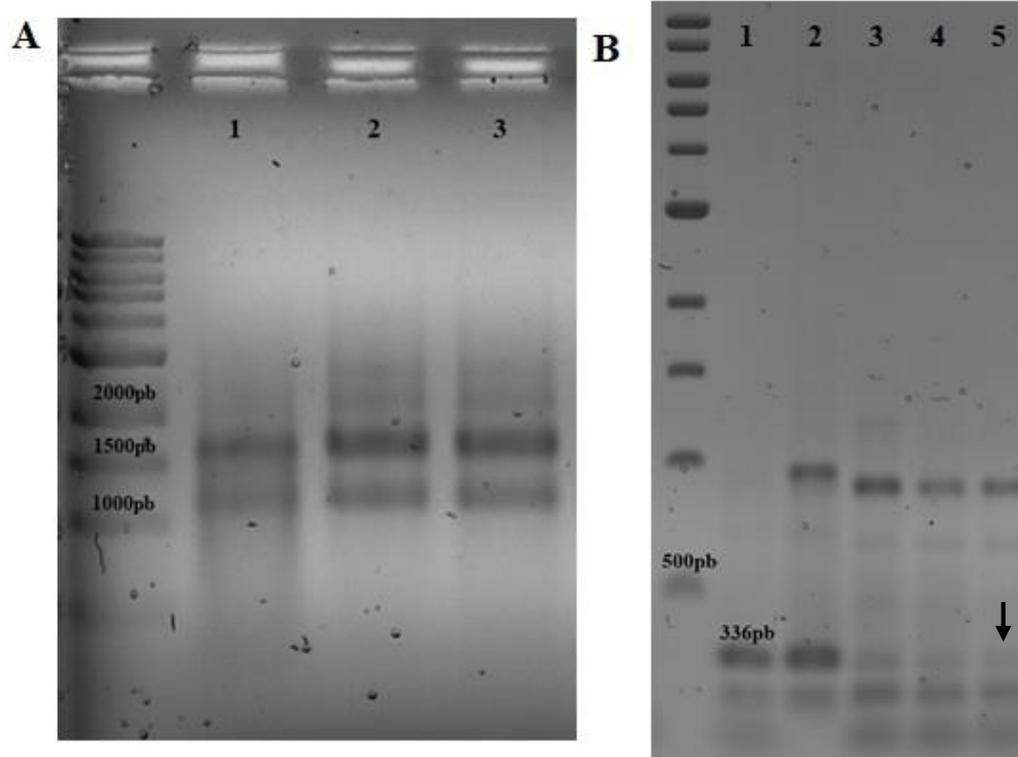
### 3.3 Ensaios qualitativos e quantitativos envolvendo Xac pDB1

#### 3.3.1 RT-PCR

A repressão da transcrição do mRNA de *parB* foi avaliada mediante tratamento da linhagem Xac pDB1 com 2mM de teofilina após um período de 1 e 2 horas. A variação de tempo aplicada neste experimento tinha como objetivo demonstrar se a produção do mRNA de *parB* decaía estando o riboswitch na presença de teofilina, evidenciando o silenciamento gênico de *parB*. Para garantir a confiabilidade deste teste qualitativo, conferimos a integralidade do RNA extraído do mutante Xac pDB1 (Figura 14a).

**Figura 14** - Extrações de RNA (a) e RT-PCR (b). Em a, temos: 1- RNA do mutante Xac pDB1 sem tratamento, 2- RNA do mesmo mutante exposto a 2mM de teofilina por 1 hora e 3- 2mM de teofilina por 2 horas. Em b: 1- Fragmento do gene *parB* (336 pb) amplificado a partir do DNA cromossômico de Xac selvagem com primers parBRTF/parBRTR (controle), 2- RNA bruto de Xac pDB1 amplificado por PCR com primers parBRTF/parBRTR (controle – 336 pb), 3- Produto de PCR *parB* (336 pb) amplificado através do cDNA de Xac pDB1 sem

tratamento com teofilina, 4- Produto de PCR *parB* (336 pb) amplificado através do cDNA de XacpDB1 tratada pelo período de 1 hora na presença de 2mM teofilina e 5- Produto de PCR *parB* amplificado através do cDNA de XacpDB1 tratada pelo período de 2 horas na presença 2mM teofilina, onde a seta indica a banda de 336 pb apresentando uma intensidade de brilho mais fraca em relação às canaletas 3 e 4.



imagens adquiridas com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

Com os resultados, demonstramos que para a linhagem não tratada com teofilina há amplificação de um produto de PCR com 336 pb correspondente ao fragmento do gene *parB* (Figura 14b, canaleta 1). Ao tratarmos com 2mM de teofilina por 1 hora (Figura 14b, canaleta 2) e 2 horas (Figura 14b, canaleta 3), podemos notar claramente um desaparecimento gradativo da banda diagnóstico de exatos 336 pb. Portanto, concluímos através do teste qualitativo de RT-PCR que há controle da transcrição de *parB*, um indício da potencialidade do riboswitch *theo/metE* como ferramenta genética neste estudo.

### 3.3.2 qRT-PCR - inibição da transcrição de *parB*

Os detalhes do cultivo da linhagem Xac pDB1 realizado para este ensaio estão resumidos no Anexo 1. O PCR do gene normalizador *rpoB* para cada amostra está apresentado na figura 15, e o resultado final do qPCR está ilustrado na figura 16. O objetivo deste ensaio

foi demonstrar quantitativamente qual a porcentagem de eficiência do riboswitch ao silenciar o gene *parB* na presença de 2mM de teofilina nos tempos de análise estabelecidos de 1 hora e 2 horas com tratamento.

O PCR convencional do gene normalizador foi elaborado para checar apenas se a intensidade de brilho do amplicon *rpoB* visivelmente manteve-se constante entre as amostras. O qPCR é o experimento mais importante deste estudo, o qual mostraria quantitativamente a diferença na amplificação de *parB* entre as amostras não tratadas e tratadas com 2mM de teofilina. O resultado esperado seria uma queda na amplificação de *parB* pelo qPCR que indicaria a eficiência do riboswitch *theo/metE* na inibição da transcrição.

**Figura 15.** Amplificação do gene normalizar *rpoB* (103 pb) para todas as amostras utilizadas neste qPCR. O DNA cromossômico de *Xac* selvagem foi utilizado como controle (\*). PM: Marcador de peso molecular (250 pb).

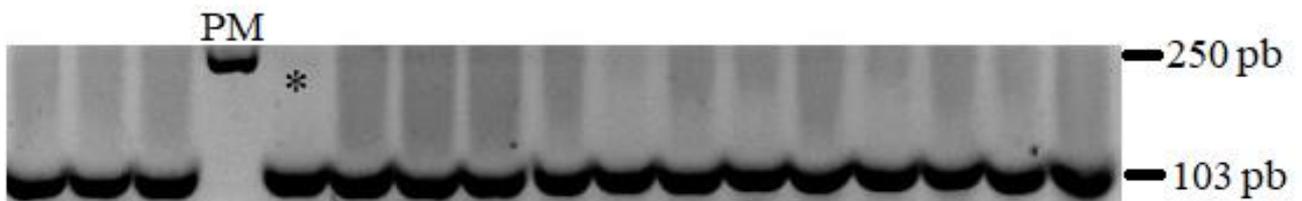


imagem adquirida com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

Pode-se observar pela figura a cima que a intensidade de brilho do amplicon *rpoB* é semelhante para todas as amostras. A partir desta etapa, foi possível dar início ao ensaio de qPCR. Com o ensaio de qPCR, foi possível demonstrar de modo quantitativo que o riboswitch *theo/metE* apresentou-se eficiente ao inibir a transcrição de *parB* na presença de teofilina na concentração de 2 mM por 1 e 2 horas, ilustrado na figura a seguir.

**Figura 16 -** Resultado final do qPCR de *parB*. T inicial: tempo inicial de 4 horas de crescimento bacteriano na ausência de teofilina. Controles: 1h e 2h - amplificação de *parB* a partir do cDNA das amostras não tratadas com teofilina após 5 horas e 6 horas de crescimento, respectivamente. Teo: teofilina. 1h+teo e 2h+teo: indica presença de teofilina no crescimento celular. (\*) indica pouca variação estatística, ainda assim aceitável para publicação.

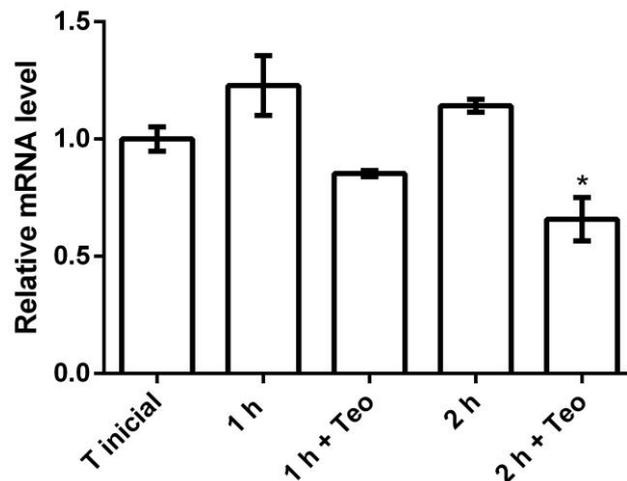


gráfico elaborado com o software Graphpad Prism 6

Conclui-se pelo ensaio de qRT-PCR que riboswitch apresentou uma eficiência de cerca de 20% ao inibir a transcrição e *parB* quando ligado ao metabólito alvo teofilina por 1 hora. Após duas horas de exposição a teofilina, a eficiência de inibição de *parB* pela ação do riboswitch aumentou para 50%. Os resultados indicam a consistência e a confiabilidade de que o riboswitch *theo/metE* é uma ferramenta genética em potencial para inibir a transcrição de *parB*, neste caso, e também para outros genes em potencial em *Xanthomonas citri*.

Variações na estrutura do riboswitch poderiam levar a respostas melhores, já que esta é uma molécula que apresenta uma estrutura tridimensional ON/OFF. Na literatura, encontram-se estudos envolvendo diferentes variações em um mesmo riboswitch para alcançar resultados melhores em estudos envolvendo controle de transcrição e tradução, como por exemplo, via in silico (WACHSMUTH et al., 2012; BORUJENI et al., 2016). Neste estudo, a eficácia máxima de atuação do riboswitch *theo/metE* foi demonstrada pela taxa de 50% da inibição de transcrição do gene *parB*, estando o riboswitch na presença de 2mM de teofilina por duas horas. Portanto, variações na estrutura do riboswitch *theo/metE* utilizado neste estudo poderia levar a uma taxa de eficiência maior do que 50%.

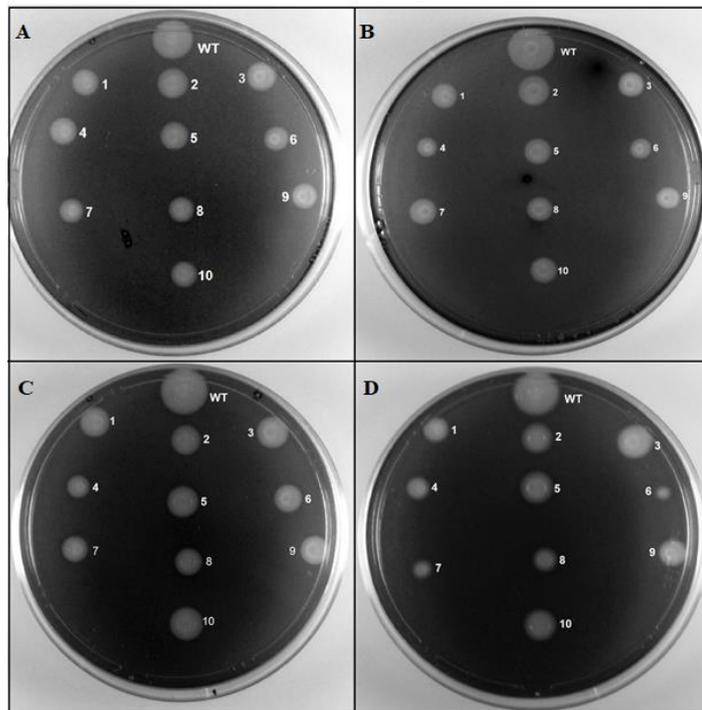
É importante se considerar que os riboswitches não atingem 100% de sua funcionalidade, ou seja, os riboswitches atuam inibindo ou induzindo a transcrição e a tradução em microrganismos de forma parcial. Portanto, a estratégia encontrada na literatura de se variar a estrutura de um riboswitch é válida para se alcançar uma maior eficiência no controle da expressão gênica.

### 3.4 Ensaio qualitativos e quantitativos com Xac pDB2

### 3.4.1 Ensaio qualitativo de degradação de amido por Xac pDB2

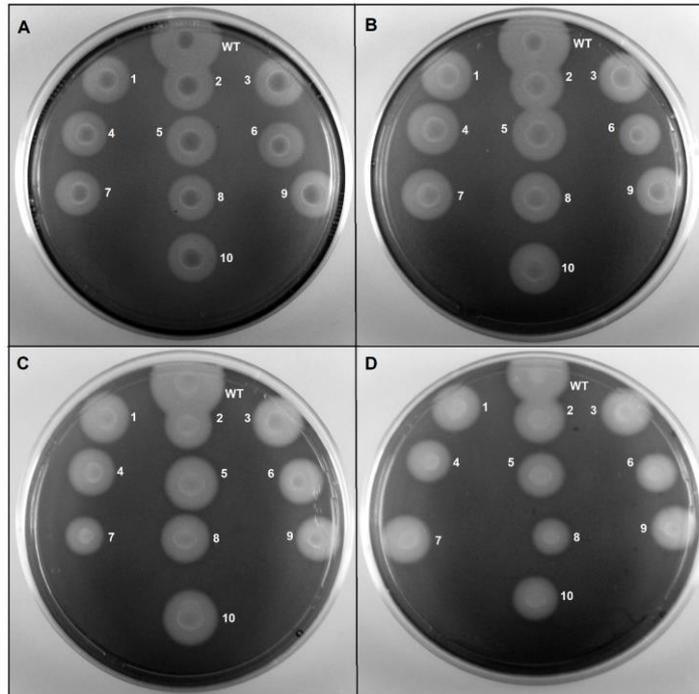
Para dosarmos a concentração de teofilina ideal para a inibição da transcrição do gene  $\alpha$ -amilase da linhagem Xac pDB2 pela ação do riboswitch, conduzimos um ensaio de degradação de amido em placas NYG/ampicilina (20  $\mu$ g/mL) e 0,2% amido (Figuras 17 e 18). Utilizamos diferentes concentrações de teofilina: ausência, 2mM, 4mM e 8mM. Todos os dez mutantes obtidos da linhagem Xac pDB2 foram testados. Determinamos Xac selvagem como um controle do experimento. Nosso objetivo foi demonstrar se há alguma variação na degradação de amido entre a Xac selvagem e a linhagem Xac pDB1.

**Figura 17** -Teste de silenciamento de  $\alpha$ -amilase com a linhagem Xac pDB2 em crescimento por 24 horas na ausência (A) e presença de teofilina a 2 mM (B), 4 mM (C) e 8 mM (D). Podemos observar que é evidente a diferença que há na degradação de amido entre a Xac selvagem e os mutantes Xac pDB2. WT: Xac selvagem. 1 a 10: mutantes Xac pDB2.



imagens adquiridas com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

**Figura 18** - Teste de silenciamento de  $\alpha$ -amilase com a linhagem Xac pDB2 em crescimento por 48 horas na ausência (A) e presença de teofilina a 2mM (B), 4mM (C) e 8mM (D). O diâmetro dos halos de degradação de amido são maiores quando comparados ao teste de 24 horas quando em diferentes concentrações de teofilina. WT: Xac selvagem. 1 a 10: mutantes Xac pDB2.



imagens adquiridas com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

Com os resultados, nota-se que mesmo na ausência de teofilina, pode-se observar a diferença no tamanho dos halos de degradação de amido entre a bactéria selvagem e a linhagem Xac pDB2, o que pode ser decorrente da própria condição de mutante devido a presença do riboswitch *theo/metE* entre a sequência *upstream amy* e o gene  $\alpha$ -amilase na linhagem Xac pDB2. Desta maneira, decidiu-se realizar ensaios quantitativos pela determinação de açúcares redutores para mensurar a atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase, pois o ensaio qualitativo de degradação de amido não foi conclusivo.

Em relação ao ensaio de degradação de amido pelo período de 48 horas, a diferença no diâmetro nos halos aumenta consideravelmente, tanto na bactéria selvagem quanto na linhagem Xac pDB2. Porém, após o teste de crescimento por 48 horas (Figura 18), aumenta-se a possibilidade da degradação da teofilina como fonte de carbono em adição a presença de amido como nutriente para o metabolismo celular das bactérias testadas.

### 3.4.2 Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase de Xac pDB2

O crescimento de 72 horas e as respectivas DO<sub>600nm</sub> observadas neste procedimento estão resumidos na Tabela 6. As leituras de DO<sub>540nm</sub> também estão resumidas na Tabela 7, onde pode-se observar a atividade de  $\alpha$ -amilase da bactéria selvagem e da linhagem Xac pDB2 ao longo de 72 horas. Destaca-se que nas primeiras 12 horas de crescimento, identificou-se a

concentração de 2,44 U/ml e 1,36 U/ml de  $\alpha$ -amilase para a bactéria selvagem e para Xac pDB2, respectivamente, ambas na ausência de teofilina.

**Tabela 6 - Crescimento bacteriano.**

Amostra	Absorbância 600nm					
	12h	24h	36h	48h	60h	72h
Xac selvagem - sem teofilina	1,2	2	2,4	2,2	2,4	2
Xac selvagem - com teofilina	1	1,8	2,4	2,1	2,3	2
Xac pDB2 - sem teofilina	1,4	1,64	2,4	2,12	2,4	2
Xac pDB2 - com teofilina	1,3	1,6	2,3	2,2	2	2

**Tabela 7 - Atividade de  $\alpha$ -amilase.**

Amostra	Absorbância 540nm	
	36h	72h
Xac selvagem	0,15 - sem teofilina ( <b>2,44 U/ml</b> )	0,15 - sem teofilina ( <b>2,44 U/ml</b> )
Xac selvagem	0,15 - com teofilina ( <b>2,44 U/ml</b> )	0,15 - com teofilina ( <b>2,44 U/ml</b> )
Xac pDB2	0,08 - sem teofilina ( <b>1,32 U/ml</b> )	0,08 - sem teofilina ( <b>1,32 U/ml</b> )
Xac pDB2	0,06 - com teofilina ( <b>1 U/ml</b> )	0,06 - com teofilina ( <b>1 U/ml</b> )

Com os resultados obtidos, observa-se que a atividade de  $\alpha$ -amilase tanto da bactéria selvagem, quanto da linhagem Xac pDB manteve-se constante e também apresentou baixa atividade (U/ml). Nota-se que há controle da inibição da transcrição do gene de  $\alpha$ -amilase pelo riboswitch quando este encontra-se na presença de seu metabólito alvo, a teofilina. Esta inibição da transcrição de  $\alpha$ -amilase leva a um decaimento na produção desta enzima quando a linhagem Xac pDB2 foi cultivada em meio de cultura contendo teofilina.

Além disso, há uma diferença na produção de  $\alpha$ -amilase em torno de 50% ao comparar a produção desta enzima entre a bactéria selvagem com a linhagem Xac pDB2 na ausência de teofilina. A hipótese é que a própria alteração genética feita na bactéria selvagem por eletroporação para dar origem à linhagem Xac pDB2 levou a esta diferença na produção de  $\alpha$ -amilase. Esta diferença é consistente, e pode ser observada qualitativamente no teste em placa com NYG e 0,2% de amido realizado neste estudo (Figuras 17 e 18), que evidencia a diferença no tamanho dos halos de degradação de amido entre a bactéria selvagem e a linhagem Xac pDB2.

Sítios para ação de *Dam metilase*, enzimas que adicionam grupos metil em 5' GATC do DNA (adenina), poderiam levar a variação na resposta da produção da enzima  $\alpha$ -amilase neste estudo. Porém, esta hipótese está descartada, pois o riboswitch *theo/metE* utilizado neste estudo não possui sítio em sua sequência de DNA para ação de *Dam metilase*.

### 3.4.3 Avaliação de inibição da transcrição de $\alpha$ -amilase por qRT-PCR

Os detalhes do cultivo da linhagem Xac pDB2 realizado para este ensaio estão resumidos no Anexo 2. O PCR do gene normalizador *rpoB* para cada amostra está representado na figura 19, e o resultado final do qPCR está ilustrado na figura 20. Os padrões estabelecidos para o ensaio de *parB* foram aplicados também para este ensaio que utilizou o gene de  $\alpha$ -amilase de *Xanthomonas citri*. O objetivo deste ensaio foi demonstrar quantitativamente qual a porcentagem de eficiência do riboswitch ao silenciar o gene  $\alpha$ -amilase na presença de 2mM de teofilina nos tempos de análise estabelecidos de 1 hora e 2 horas com tratamento.

O PCR convencional foi elaborado para checar apenas se a intensidade de brilho do amplicon *rpoB* visivelmente manteve-se constante entre as amostras. Após a confirmação deste padrão, finalmente o ensaio de qRT-PCR do gene  $\alpha$ -amilase de Xac foi realizado (Figura 20). O qPCR foi essencial para demonstrar quantitativamente a inibição do gene de  $\alpha$ -amilase pela ação do riboswitch *theo/metE* quando na presença de 2mM de teofilina.

**Figura 19** - Amplificação do gene normalizar *rpoB* (103 pb) para todas as amostras utilizadas neste qPCR. O DNA cromossômico de Xac selvagem foi utilizado como controle (\*). PM: marcador de peso molecular (250 pb).

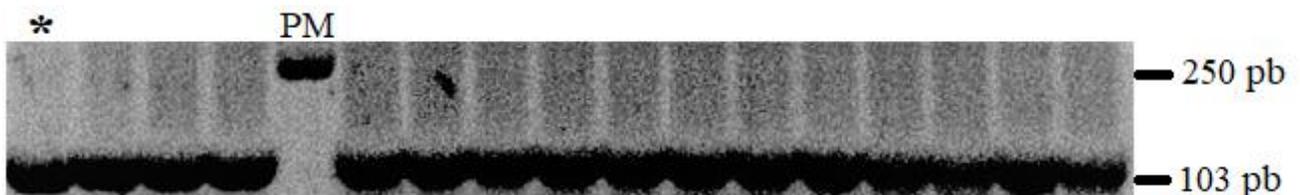


imagem de gel de eletroforese adquirido com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

**Figura 20** – qPCR do gene  $\alpha$ -amilase. T inicial: tempo inicial de 4 horas de crescimento bacteriano na ausência de teofilina. Controles: 1h e 2h - amplificação de  $\alpha$ -amilase a partir do cDNA das amostras não tratadas com teofilina após 5 horas e 6 horas de crescimento, respectivamente. Teo: teofilina. 1h+teo e 2h+teo: indica presença de teofilina no crescimento celular. (\*) indica pouca variação estatística, ainda assim aceitável para publicação.

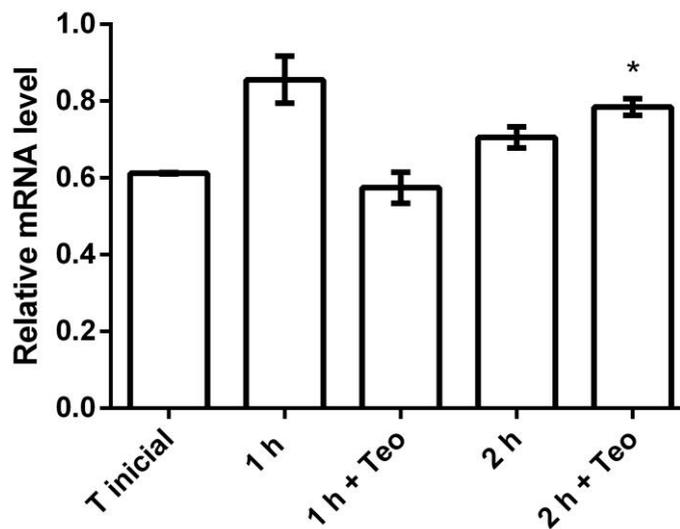


gráfico elaborado com o software Graphpad Prism 6

Nota-se que o riboswitch *theo/metE* apresentou-se uma ferramenta genética eficiente para inibir a transcrição do gene  $\alpha$ -amilase estando ligado ao seu metabólito alvo, a teofilina, na concentração de 2 mM por 1 hora. Com o resultado, conclui-se que esta eficiência esteja em torno de 30%. Após o período de 1 hora, nota-se que não ocorre inibição da transcrição de  $\alpha$ -amilase na presença de teofilina. Isto indica que para o gene de  $\alpha$ -amilase, a atuação do riboswitch ocorre de maneira mais rápida, diferente do que foi observado no qPCR do gene *parB*, onde a eficiência da inibição da transcrição aumenta consideravelmente após 2 horas, ou seja, de 20% observado no período de 1 hora para 50% de eficiência em 2 horas.

Portanto, para os genes  $\alpha$ -amilase e *parB*, o riboswitch silencia a transcrição com uma eficiência de 30% e 20%, respectivamente, desde que ligado a teofilina por 1 hora. De maneira geral, através dos resultados obtidos pelo qPCR, conclui-se que o riboswitch *theo/metE* realmente apresentou-se como uma ferramenta genética em potencial, o que permite a realização de futuros estudos sobre silenciamento gênico envolvendo outros genes de *Xanthomonas citri*.

Riboswitches são RNAs regulatórios que ocorrem naturalmente em diversas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Desde as primeiras descrições dos riboswitches, no ano de 2002 (MIRONOV et al., 2002; WINKLER et al., 2002; NAHVI et al., 2002), um pouco mais de uma década atrás, os riboswitches passaram a ser utilizados em diversas práticas por serem uma ferramenta atrativa, segundo MACHTEL et al (2016), para a indústria, medicina, farmácia e proteção ambiental. Para a realização deste estudo, os riboswitches despertaram interesse por estarem sendo utilizados como ferramenta genética para regulação

gênica em diferentes espécies de bactérias, como por exemplo, em *Escherichia coli* (CARON et al., 2012) e *Bacillus subtilis* (PEDROLLI et al., 2015).

Neste estudo, utilizamos o riboswitch sintético *theo/metE* para silenciamento gênico de *parB* e  $\alpha$ -amilase em *Xanthomonas citri*, uma bactéria gram-negativa, agente etiológico do Cancro cítrico. Destacamos a utilização deste riboswitch como uma nova ferramenta genética para estudos envolvendo controle da expressão gênica em Xac com base nos resultados obtidos.

Os riboswitches tem sido utilizados nos últimos anos em estudos envolvendo o controle da expressão gênica em diversas espécies de bactérias, inclusive em Arquea e vírus (BERENS & SUESS, 2015), e também em eucariotos (CRUZ-BUSTOS et al., 2017; BEJUGAM & SINGH, 2018), com intuito de se induzir o término prematuro da transcrição, inibir o início da tradução e também alteram as taxas de decaimento do mRNA, desde que ligados a pequenas moléculas chamadas de ligantes (LEE & OH, 2015). Adicionalmente, os riboswitches também podem operar simultaneamente na transcrição e na tradução (PEDROLLI et al., 2015). Há ainda estudos que descrevem o potencial dos riboswitches que ocorrem naturalmente em bactérias patogênicas como possíveis alvos para ação de antibióticos, já que riboswitches controlam a expressão de genes essenciais nestas bactérias (BLOUNT et al., 2006).

Utilizou-se para este estudo o riboswitch *theo/metE* que é inibidor de transcrição. O estudo obteve sucesso ao demonstrar que este riboswitch foi eficaz ao inibir a transcrição de *parB* e  $\alpha$ -amilase. Esta eficiência comprovada permite utilizar agora esta mesma quimera para novos estudos de silenciamento de genes em Xac, inclusive para silenciar genes que poderiam estar envolvidos na patogenicidade de Xac, por exemplo. Ao demonstrar as consequências da inibição da transcrição de genes envolvidos com a patogenicidade de Xac com este riboswitch, seria possível tornar tais genes novos alvos para ação de antibióticos, desde que caracterizados como genes essenciais para a sobrevivência e virulência desta bactéria.

Como descrito anteriormente, para muitas bactérias, os métodos simples usados para induzir a expressão gênica de uma maneira dependente de ligante não existem (TOPP et al., 2010). A utilização dos riboswitches é uma alternativa a estes métodos simples para regulação gênica em bactérias, como deleção e depleção gênica. Neste estudo, optou-se pelo uso de um riboswitch como uma nova ferramenta genética para regulação gênica em Xac, em contrapartida aos métodos simples para regulação gênica que há tempos já são bem caracterizados nesta bactéria.

## CONCLUSÃO

Construiu-se com este estudo duas linhagens mutantes de *Xanthomonas citri*, a *Xac pDB1* e a *Xac pDB2*, carregando alterações genéticas significativas, onde o riboswitch *theo/metE* está localizado entre os genes *parA* e *parB*, e entre a sequência de coordenada genômica c949424..948665 e o gene  $\alpha$ -amilase, respectivamente. Determinou-se o perfil de crescimento destas duas linhagens mutantes de *Xac*. Definiu-se a dose de 2mM de teofilina como a mais adequada para a atuação do riboswitch *theo/metE*, e os tempos de 1 hora para inibir a transcrição de  $\alpha$ -amilase e de 1 a 2 horas para inibir a transcrição de *parB*. Constatou-se que há decaimento da atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase em U/ml na presença de 2mM de teofilina ao longo de 72 horas. Determinou-se que a eficiência do riboswitch *theo/metE* na inibição da transcrição chegou a 50%. Este estudo é pioneiro ao utilizar um riboswitch sintético para controle da expressão gênica em *Xanthomonas citri*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEJUGAM, P.R.; SINGH, S. Engineering riboswitch in L. major: **From prediction to conceptualization**. International Journal of Biological Macromolecules. 115:98-105. 2018.
- BERENS, C.; SUESS, B. **Riboswitch engineering — making the all-important second and third steps**. Current Opinion in Biotechnology. 31:10-15. 2015.
- BLOUNT, K.F.; BREAKER, R.R. **Riboswitches as antibacterial drug targets**. Nature Biotechnology. 24:1558–1564. 2006.
- BORUJENI, A.E.; MISHLER, D.M.; WANG, J.; HUSO, W.; SALIS, H.M. **Automated physics-based design of synthetic riboswitches from diverse RNA aptamers**. Nucleic Acids Research. 44(1):1-13. 2016.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments**. Clinical Chemistry, 55(4):611-622. 2009.
- CARON, M.P.; BASTET, L.; LUSSIER, A.; SIMONEAU-ROY, M.; MASSÉ, E.; LAFONTAINE, D.A. **Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay**. PNAS. 109:3444–3453. 2012.

CERES, P.; GARST, A.D.; MARCANO-VELÁZQUEZ, J.G.; BATEY, R.T. **Modularity of select riboswitch expression platforms enables facile engineering of novel genetic regulatory devices.** ACS synthetic biology. 2(8):463-472. 2013.

CRUZ-BUSTOS, T.; RAMAKRISHNAN, S.; CORDEIRO, C.D.; AHMED, M.A.; DOCAMPO, R. **A Riboswitch-based Inducible Gene Expression System for *Trypanosoma brucei*.** The Journal of Eukaryotic Microbiology. 65(3):412-421. 2017.

da SILVA, I.C.; REGASINI, I.O.; PETRONIO, M.S.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; BELASQUE Jr., J.; SACRAMENTO, L.V.; FERREIRA, H. **Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Journal of bacteriology. 195:85-94. 2013.

DESAI, S.K.; GALLIVAN, J.P. **Genetic Screens and Selections for Small Molecules Based on a Synthetic Riboswitch That Activates Protein Translation.** Journal of the American Chemical Society. 126(41):13247-13254. 2004.

FERREIRA, H.; BARRIENTOS, F.J.A.; BALDINI, R.L.; ROSATO, Y.B. **Electrotransformation in three pathovars of *Xanthomonas campestris*.** Applied Microbiology and Biotechnology. 43(4):651-655. 1995.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. **Cancro cítrico.** Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. Acesso em 21 de maio de 2018.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. **MAPA oficializa sistema de mitigação de risco de cancro cítrico em São Paulo.** Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/mapa-oficializa-sistema-de-mitigacao-de-risco-de-cancro-citrico-em-sao-paulo/525>. Acesso em 21 de Maio de 2018.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. **Ministério da Agricultura publica nova IN sobre cancro cítrico.** Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/ministerio-da-agricultura-publica-nova-in-sobre-cancro-citrico/681>. Acesso em 02 de Agosto de 2018.

JACOB, T.R.; LAIA, M.L.; FERRO, J.A.; FERRO, M.I.T. **Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*.** Biotechnology Letters. 33(6):1177-1184. 2011.

KIM, S.; THIESSEN, P. A.; BOLTON, E. E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S. H. **PubChem substance and compound databases.** Nucleic Acids Research. 44(1):1202-1213. 2016.

LACERDA, L.A; CAVALCA, L.B.; MARTINS, P.M.M.; GOVONE, J.S.; BACCI Jr, M.; FERREIRA, H. **Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Plasmid. 90:44-52. 2017.

- LEE, S.W.; OH, M.K. **A synthetic suicide riboswitch for the high-throughput screening of metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Metabolic Engineering*. 28:143-150. 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  Method.** *Methods*, 25:402-408. 2001.
- LORENZONI, A.S.G.; DANTAS, G.C.; BERGSMA, T.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D.J. ***Xanthomonas citri* MinC Oscillates from Pole to Pole to Ensure Proper Cell Division and Shape.** *Frontiers in Microbiology*. 8:1-12. 2017.
- MACHTEL, P.; BAŁKOWSKA-ŻYWICKA, K.; ŻYWICKI, M. **Emerging applications of riboswitches – from antibacterial targets to molecular tools.** *Journal of Applied Genetics*. 57:531–541. 2016.
- MARTINS, P.M.M.; LAU, I.F.; BACCI, M; BELASQUE, J.; DO AMARAL, A.M.; TABOGA, S.R.; FERREIRA, H. **Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: Targeting the division septum.** *FEMS Microbiology Letters*. 310:76-83. 2010.
- MCCOWN, P.J.; CORBINO, K.A.; STAV, S.; SHERLOCK, M.E.; BREAKER, R.R. **Riboswitch diversity and distribution.** *RNA*. 23(7):995-1011. 2017.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, Washington. 31(3):426-428. 1959.
- MIRONOV, A.S.; GUSAROV, I.; RAFIKOV, R.; LOPEZ, L.E.; SHATALIN, K.; KRENEVA, R.A.; PERUMOV, D.A.; NUDLER, E. **Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria.** *Cell*. 111:747–756. 2002.
- NAHVI, A.; SUDARSAN, N.; EBERT, M.S.; ZOU, X.; BROWN, K.L.; BREAKER, R.R. **Genetic control by a metabolite binding mRNA.** *Chemistry & Biology*. 9:1043– 1049. 2002.
- NUDLER, E.; MIRONOV, S.A. **The riboswitch control of bacterial metabolism.** *TRENDS in Biochemical Sciences*. 29(1):11-17. 2004.
- OLIVEIRA, A.P.A.; SILVESTRE, M.A.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. **Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts.** *African Journal of Biotechnology*. 14:1215-1223. 2015.
- PEDROLI, D.B.; KÜHM, C.; SÉVIN, D.C.; VOCKENHUBER, M.P.; SAUER, U.; SUESS, B.; MACK, M. **A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in *Bacillus subtilis*.** *PNAS*. 112:14054-14059. 2015.
- PEDROLI, D; LANGER, S; HOBL, B; SCHWARZ, J; HASHIMOTO, M; MACK, M. **The *ribB* FMN riboswitch from *Escherichia coli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis.** *The FEBS Journal*. 282:3230-3242. 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; Maniatis, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

SEIDMAN, C. E.; K. STRUHL, J. S.; JESSEN, T. Introduction of plasmid DNA into cells, p. 1.8.1–1.8-10. In F. M. Ausubel et al. (ed.), **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., vol. 1, 1997.

SHERLOCK, M.E.; SUDARSAN, N.; STAV, S.; BREAKER, R.R. **Tandem riboswitches form a natural Boolean logic gate to control purine metabolism in bacteria**. *Biochemistry and Chemical Biology*. 7:1-17. 2018.

SILVA, A.C.R.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.C.; do AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.B.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.S.; FERREIRA, R.C.C.; FERRO, M.I.T.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.M.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.M.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.D.; SILVA, C.; de SOUZA, R.F.; SPINOLA, L.A.F.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P. **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities**. *Nature*. 417:459-463. 2002.

SUESS, B.; FINK, B.; BERENS, C.; STENTZ, R.; HILLEN, W. **A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo**. *Nucleic Acids Research*. 32(4):1610-1614. 2004.

TAYLOR, S; WAKEM, M; DIJKMAN, G; ALSARRAJ, M; NGUYEN, M. **A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines**. *Methods*, 50:1-5. 2010.

TOPP, S.; REYNOSO, C.M.K.; SEELIGER, J.C.; GOLDLUST, I.S.; DESAI, S.K.; MURAT, D.; SHEN, A.; PURI, A.W.; KOMEILI, A.; BERTOZZI, C.R.; SCOTT, J.R.; GALLIVAN, J.P. **Synthetic Riboswitches That Induce Gene Expression in Diverse Bacterial Species**. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(23):7881-7884. 2010.

UCCI, A.P.; MARTINS, P.M.; LAU, I.F.; BACCI, M.; BELASQUE Jr, J.; FERREIRA, H. **Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri***. *Microbiology Open*. 3:29-41. 2014.

WACHSMUTH, M.; FINDEIB, S.; WEISSHEIMER, N.; STADLER, P.F.; MÖRL, M. **De novo design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination**. *Nucleic Acids Research*. 41:2541-2551. 2012.

WINKLER, W.; NAHVI, A.; BREAKER, R.R. **Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression.** Nature. 419:952–956. 2002.

YOCUM, R.R.; PERKIS, J.B.; HOWITT, C.L.; PERO, J. **Cloning and characterization of the metE gene encoding S-adenosylmethionine synthetase from *Bacillus subtilis*.** Journal of Bacteriology. 178(15):4604-4610. 1996.

**ANEXO 1** - Detalhes do cultivo da linhagem Xac pDB1 nas condições de ausência/presença de 2mM de teofilina para realização do ensaio de qRT-PCR do gene *parB*.

Crescimento bacteriano nas primeiras 4 horas.

Amostra	DO 600nm	CFU/ml
Xac pDB2 sem tratamento	0.4	$5 \times 10^9$
Xac pDB2 sem tratamento	0.4	$4 \times 10^9$
Xac pDB2 sem tratamento	0.4	$5 \times 10^9$

Crescimento bacteriano após 1 hora de exposição a 2mM de teofilina.

Amostra	DO 600nm	CFU/ml
Xac pDB2 sem tratamento	0.47	$7 \times 10^9$
Xac pDB2 com tratamento	0.42	$5 \times 10^9$
Xac pDB2 sem tratamento	0.43	$6 \times 10^9$
Xac pDB2 com tratamento	0.42	$5 \times 10^9$
Xac pDB2 sem tratamento	0.44	$7 \times 10^9$
Xac pDB2 com tratamento	0.42	$5 \times 10^9$

Crescimento bacteriano após 2 hora de exposição a 2mM de teofilina.

Amostra	DO 600nm	CFU/ml
Xac pDB2 sem tratamento	0.62	$5 \times 10^9$
Xac pDB2 com tratamento	0.54	$8 \times 10^9$
Xac pDB2 sem tratamento	0.57	$7 \times 10^9$

Xac pDB2 com tratamento	0.52	$4 \times 10^9$
Xac pDB2 sem tratamento	0.58	$8 \times 10^9$
Xac pDB2 com tratamento	0.55	$5 \times 10^9$

**ANEXO 2** - Detalhes do cultivo da linhagem Xac pDB2 nas condições de ausência/presença de 2mM de teofilina para realização do ensaio de qRT-PCR do gene *alfa-amilase*.

Crescimento bacteriano nas primeiras 4 horas.

Amostra	DO 600nm	CFU/ml	Quantificação de RNA/DNAse (ng/ $\mu$ l)
Xac pDB2 sem tratamento	0.27	$5 \times 10^9$	61,6
Xac pDB2 sem tratamento	0.26	$6 \times 10^9$	37
Xac pDB2 sem tratamento	0.26	$5 \times 10^9$	32

Crescimento bacteriano após 1 hora de exposição a 2mM de teofilina.

Amostra	DO 600nm	CFU/ml	Quantificação de RNA/DNAse (ng/ $\mu$ l)
Xac pDB2 sem tratamento	0.37	$6 \times 10^9$	47,5
Xac pDB2 com tratamento	0.36	$6 \times 10^9$	49,2
Xac pDB2 sem tratamento	0.37	$7 \times 10^9$	55,6
Xac pDB2 com tratamento	0.32	$6 \times 10^9$	45,4
Xac pDB2 sem tratamento	0.32	$7 \times 10^9$	54,2
Xac pDB2 com tratamento	0.32	$6 \times 10^9$	46,3

Crescimento bacteriano após 2 horas de exposição a 2mM de teofilina.

Amostra	DO 600nm	CFU/ml	Quantificação de RNA/DNAse (ng/ $\mu$ l)
Xac pDB2 sem tratamento	0.52	$9 \times 10^9$	35,4
Xac pDB2 com tratamento	0.5	$9 \times 10^9$	56
Xac pDB2 sem tratamento	0.48	$9 \times 10^9$	64,5
Xac pDB2 com tratamento	0.4	$9 \times 10^9$	56,2
Xac pDB2 sem tratamento	0.42	$9 \times 10^9$	55,4
Xac pDB2 com tratamento	0.4	$8 \times 10^9$	55,2