



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Caracterização do promotor do gene da piruvato descarboxilase (*pdh*)
de *Zymomonas mobilis***

Vanessa Rodrigues Vieira

Orientadora: Lídia Maria Pepe de Moraes

Brasília

20221

Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade

**Caracterização do promotor do gene da piruvato descarboxilase (*pdc*)
de *Zymomonas mobilis***

Vanessa Rodrigues Vieira

Orientadora: Lídia Maria Pepe de Moraes

Tese de doutorado apresentada
ao departamento de Biologia
Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de
Brasília como requisito parcial
para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia e
Biodiversidade

Brasília, 2021

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação da professora Lídia Maria Pepe de Moraes e com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora

Professora Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Universidade de Brasília

Presidente da Banca

Professora Dra. Fernanda Mulinari Fontana

CEUB

Examinadora Externa

Dra. Luiza Cesca Piva

Examinadora Externa

Professor Dr. Ricardo Henrique Krüger

Universidade de Brasília

Examinador interno

Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Universidade de Brasília

Membro Suplente

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por me iluminar, proteger e me dar força para trilhar esse caminho.

A minha família por sempre estar presente, meus filhos Augusto e Ana Carolina por me ajudar, compreender, me acompanhar e estar sempre perto quando precisei, ao meu marido Rodrigo por me incentivar, dar força, entender minhas dificuldades e compreender minha ausência.

Aos meus pais Ivana e Itacir por sempre estarem prontos para ajudar, me apoiar e me seguir a onde quer que eu fosse,

A professora Lídia por me aceitar como sua aluna, pela oportunidade, pelo apoio e ajuda sempre quando necessário.

Ao professor Fernando Araripe e Janice De Marco pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade para ajudar.

Aos amigos e colegas de laboratório, Yasmin, Carmen, Ana Laura, Luiza, Francisco, Igor, Pedro, Roberta, Tiago, Myrna, Marciano, Maritza e Viviane que sempre me ajudaram quando precisei.

À minha amiga Christiane por toda ajuda, pelos conselhos, força, ensinamentos e descontração nos almoços e idas a Cacau Show.

Ao professor Dr. André Nicola por toda ajuda com os experimentos de Citometria de fluxo, ao professor Dr. Túlio e professor Márcio pela ajuda nos experimentos de EMSA.

Aos técnicos da BioMol, Thompson e José, pela disponibilidade e ajuda.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e por agregar melhorias ao meu trabalho.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram e me ajudaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Sumário

Lista de Figuras	I
Lista de Tabelas	II
Lista de Abreviaturas e Símbolos	III
Resumo	V
Abstract	VI
1.0 Introdução	3
1.1 Abactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	3
1.2 Metabolismo de <i>Z. mobilis</i>	7
1.3 Promotores	11
1.4 5'UTR (<i>Untranslated region</i>)	17
2.0 Objetivo	19
2.1 Objetivos específicos	19
3.0 Materiais	20
3.1 Micro-organismos e plasmídeos utilizados	20
3.2 Meios de cultura e cultivo celular.....	24
3.3 Soluções para transformação de células bacterianas	25
3.4 Soluções para preparo de DNA plasmidial	27
3.5 Soluções para manipulações genéticas	28
3.6 Materiais e soluções para análise de proteína	29
3.7 Soluções e materiais para gel de poliacrilamida para ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (EMSA)	31
3.8 Soluções para <i>Western Botting</i>	32
4.0 Métodos	34
4.1 Preparo de células competentes para eletroporação	34
4.2 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep)	34
4.3 Preparação de DNA plasmidial em média e grande escala (Midi e Maxiprep)	35
4.4 Análise de ácidos nucleicos por eletroforese	36
4.5 Purificação e eluição de fragmentos de DNA	36
4.6 Quantificação de DNA	36
4.7 Transformação e preparação de células competentes de <i>E. coli</i> por choque térmico com RbCl	36

4.8	Transformação de <i>Z. mobilis</i> ZM4 por eletroporação	37
4.9	Construção de plasmídeos e manipulação de DNA	37
4.10	Precipitação de DNA	38
4.11	Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
4.12	Oligonucleotídeos utilizados	39
4.13	Sequenciamento de plasmídeos	40
4.14	Análises de Bioinformática	40
4.15	Cultura de <i>Z. mobilis</i> recombinantes cultivadas em meio sólido	40
4.16	Teste de fluorescência em placa	40
4.17	Citometria de fluxo	41
4.18	Preparo de extrato bruto de <i>Z. mobilis</i>	41
4.19	Protocolo de ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (EMSA)	42
4.20	Eletroforese em gel de poliacrilamida	43
4.21	Construção por método de anelamento de Oligonucleotídeos	44
4.22	Ensaio de <i>Supershift</i>	44
5.	Resultados	46
5.1	Capítulo I – Construção de vetores para análise de atividade do promotor <i>pdv</i>	47
5.2	Avaliação de expressão de eGFP nas culturas de <i>Z. mobilis</i> recombinantes cultivadas em meio sólido	50
5.3	Análise da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo	51
6.0	Capítulo II – Construções para definir as regiões -10 e -35 do <i>pdv</i>	54
6.1	Mutações nas regiões -10 e -35 do promotor <i>pdv</i>	56
6.2.	Resultados de Citometria de Fluxo	58
7.0	Capítulo III – Construção de Sondas para análise por EMSA, <i>Supershift</i> e <i>Western Blotting</i> para identificar as regiões -10 e -35 de <i>pdv</i>	61
7.1	Resultados obtidos pelo método de EMSA com a utilização das sondas construídas...	62
8.0	Conclusões	65
9.0	Referências Bibliográficas	66
10.	Anexos	72

Lista de Figuras

Figura 1. Células de <i>Z. mobilis</i>	03
Figura 2. Via Metabólica de <i>Z. mobilis</i>	08
Figura 3. Estratégia para construção de <i>Z. mobilis</i> (ZM4) com plasmídeos contendo diferentes fragmentos de <i>pdc</i>	46
Figura 4. Mapa de do Vetor pB1PDC	47
Figura 5. Mapa de restrição do cassete de expressão	48
Figura 6. Fragmentos de <i>pdc</i> esperados.....	48
Figura 7. Modelo esquemático das construções desenvolvidas nesta etapa para realização de citometria de fluxo.....	49
Figura 8. Placa com cultura de <i>Z. mobilis</i> modificada	50
Figura 9. Gráficos dos resultados de citometria de fluxo analisados pelo <i>Software FlowJo</i>	51
Figura 10. Gráfico com os resultados analisados pelo software FlowJo e por ANOVA	52
Figura 11. Sequência P_{pd}c146	55
Figura 12. Construção de plasmídeos para identificação das regiões -10 e -35 do promotor <i>pdc</i> de ZM	55
Figura 13. Estratégia para definição das sequências -10 e -35 de <i>pdc</i> e identificação da sequência de início da transcrição em ZM	57
Figura 14. Controles positivos e negativos utilizados para esta estratégia	58
Figura 15. Gráfico com resultados de análises de intensidade de fluorescência	58
Figura 16. Gráfico com resultados de citometria de fluxo	59
Figura 17. Construção de Sondas para análise pelo método de EMSA, <i>Supershift</i> e <i>Western Blotting</i>	64
Figura 18. Mutação da região -35 do <i>pdc</i> de <i>Z. mobilis</i>	65
Figura 19. Gel de poli(acrilamida) utilizando o método de EMSA	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação da capacidade de produção de etanol entre <i>Z. mobilis</i> e <i>S.cerevisiae</i>	04
Tabela 2. Promotores de <i>Z. mobilis</i> caracterizados e classificados conforme a força do promotor	16
Tabela 3. Micro-organismos utilizados	20
Tabela 4. Plasmídeos utilizados	23
Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos do promotor <i>pdc</i>	43

Lista de abreviaturas e símbolos

II

A	adenina
C	citosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
FAM	5-Carboxifluoresceína (5-FAM)
eGFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
G	guanina
g	grama
g	força gravitacional
h	hora
kb	quilobase
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD ₆₀₀	densidade celular óptica medida a 600 nm
ORF	<i>Open reading frame</i> (janela aberta de leitura)
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso por volume
RNase A	ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
s	segundo
T	timina
v	volume
V	volts
v/v	volume por volume
°C	graus Celsius
μF	microfaraday
μg	micrograma
μL	microlitro

III

μm	micrômetro
Ω	ohm
RNAP	RNA polimerase
NADP	nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato
Mg	Magnésio

Resumo

A bactéria *Zymomonas mobilis* é um microrganismo que se tornou comercialmente interessante, devido às suas características fermentativas e metabólicas, principalmente para as indústrias energética e química. Esse microrganismo pode ser geneticamente manipulado e com isso é possível obter maiores titulações de bioprodutos, porém não existem muitas ferramentas genéticas desenvolvidas para que esta bactéria seja manipulada com eficiência. Esse estudo teve como objetivo caracterizar o promotor do gene (*pdc*) da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* responsável por codificar a proteína Pdc, enzima chave na produção de etanol por esta bactéria. Foram construídos vetores utilizando como base o plasmídeo pB1PDC, contendo o promotor *pdc* de 500 pb controlando a expressão do gene codificador da proteína verde fluorescente, *eGFP*. A partir deste plasmídeo foram gerados fragmentos menores do promotor *pdc*. *Z. mobilis* ZM4 foi transformada com as construções contendo os diferentes fragmentos do *PpdC* e analisada por citometria de fluxo para detectar a fluorescência de *eGFP* e com isso, verificar a força do promotor. Foram obtidos dois grupos diferentes quanto a intensidade da fluorescência de *eGFP*, o primeiro grupo com os fragmentos *PpdC*₁₄₆ pb e *PpdC*₁₉₇pb com intensidade menor de fluorescência de *eGFP*, enquanto o segundo grupo com os fragmentos *PpdC*₃₀₅, *PpdC*₄₀₅ e *PpdC*₅₀₅ com maior intensidade de fluorescência que o primeiro grupo. Estes resultados indicaram que o elemento de ligação da subunidade σ^{70} sigma 70 está contido dentro do fragmento de 146 pb, pois mesmo com o menor fragmento do promotor obteve-se fluorescência. Também foi observada a presença de uma região regulatória entre as regiões -197 e -305 do promotor, que apresentou uma diferença significativa entre os índices de fluorescência. Como estratégia para identificar o elemento de ligação no promotor da subunidade sigma foram construídos oligonucleotídeos mutantes para as prováveis regiões -10 e -35 do promotor *PpdC*₁₄₆ pb. As sequências mutadas e não mutadas das regiões -10 e -35 foram inseridas no plasmídeo pB1PDC com *PpdC*₁₄₆, e foram testadas quanto a expressão da fluorescência de *eGFP* por citometria de fluxo. A mutação na região -10 do promotor *pdc* manteve atividade de *eGFP*, no entanto, quando a região -35 foi mutada, não houve atividade de *eGFP*. Portanto, a região -35 do promotor *pdc* é a região mais importante, onde provavelmente ocorre a ligação da subunidade sigma 70 ao promotor, dando início ao processo de transcrição. No entanto, não foi possível definir o elemento de ligação da subunidade sigma 70 no promotor.

Abstract

The bacterium *Zymomonas mobilis* is a microorganism that has become commercially interesting due to its fermentative and metabolic characteristics, mainly for the energy and chemical industries. This microorganism can be genetically manipulated and it is possible to obtain higher titers of bioproducts, but there are not many genetic tools developed for this bacterium to be manipulated efficiently. The aim of this study was to characterize the promoter of the pyruvate decarboxylase (*pdc*) gene from *Z. mobilis* responsible for encoding the protein pyruvate decarboxylase, a key enzyme in the production of ethanol by this bacterium. Expression vectors were constructed using the pBBR1MCS1 plasmid as a base, containing the 500 bp *pdc* promoter controlling the *eGFP* fluorescent protein. From this plasmid, others were constructed with smaller fragments of the *pdc* promoter. *Z. mobilis* ZM4 was transformed with the constructs containing the different fragments of *PpdC* and analyzed by flow cytometry to detect the fluorescence of *eGFP* and with that, to verify the strength of the promoter. Two different groups were obtained in terms of *eGFP* fluorescence intensity, the first group with *PpdC*₁₄₆ pb and *PpdC*₁₉₇pb fragments with lower *eGFP* fluorescence intensity, while the second group with *PpdC*₃₀₅, *PpdC*₄₀₅ and *PpdC*₅₀₅ fragments with greater fluorescence intensity than the first group. This suggests that the sigma 70 subunit binding element is contained within the 146 bp fragment, because it was possible to observe fluorescence with the smallest fragment. A regulatory region was also observed entre as regiões -197 e -305, where there was a significant difference between the fluorescence indices. As a strategy to identify the Sigma 70 binding element within the promoter, -10 and -35 mutated oligonucleotides of the *PpdC*₁₄₆ bp promoter were constructed. The mutated and unmutated sequences from the -10 and -35 regions were inserted into the plasmid PBR1M*pdC*₁₄₆, and were tested for *eGFP* fluorescence expression in flow cytometry. The -10 region mutation of the *pdC* promoter maintained *eGFP* activity, however, when the -35 region was mutated, there was no *eGFP* activity. Therefore, the -35 region of the *pdC* promoter is the most important region, where the sigma 70 subunit binds to the promoter, initiating the transcription process. However, it was not possible to define the exact sequen

ce of the Sigma 70 binding element within the promoter.

1.0 Introdução

1.1 A bactéria *Zymomonas mobilis*

Atualmente muitos microrganismos fermentativos são utilizados como plataformas para produção de diversos produtos de alto valor agregado gerados por engenharia metabólica (SEO *et al.*, 2005b). *Zymomonas mobilis* tem-se mostrado um microrganismo promissor para produção de bioprodutos, como por exemplo o etanol, sorbitol, ácido glucônico, levana e outros bioprodutos com alto valor agregado, através de processo fermentativo. Além disso, *Z. mobilis* é capaz de metabolizar açúcares de forma rápida e altamente eficiente (ROGERS *et al.*, 2007a).

A espécie *Z. mobilis* começou a ser estudada no início do século XX, e em 1911, esta bactéria foi isolada por Baker e Hillier a partir da cidra, uma bebida produzida pela fermentação do suco de maçã. A cidra frequentemente se deteriorava e apresentava sinais característicos como formação de espuma, liberação de gases e aumento da acidez, gerando um líquido turvo, com depósito no fundo da garrafa. Foi na década de 1950 que pesquisadores descobriram que *Z. mobilis* utilizava uma via metabólica semelhante à utilizada por microrganismos estritamente aeróbios, como os do gênero *Pseudomonas*. Em 1950, foi nomeada de *Saccharomonas sp.* e em seguida, foi denominada *Zymomonas anaerobia* (VIAKARI; KORHOLA, 1986). No ano de 1970, foi apontada como a espécie mais rápida e eficiente produtora de etanol, empregando sacarose, glicose ou frutose como fontes únicas de carbono e energia (DOELLE *et al.*, 1993). No entanto, *Z. mobilis* não foi classificada taxonomicamente até 1976 quando o gênero *Zymomonas* foi reclassificado dentro de uma espécie com duas subespécies *Z. mobilis subsp. mobilis* e *Z. mobilis subsp. pomaceae* (SWINGS; DE LEY, 1977).

Foi na década de 1950 que pesquisadores descobriram que *Z. mobilis* utilizava uma via metabólica semelhante à utilizada por microrganismos estritamente aeróbios, como os do gênero *Pseudomonas*. Neste mesmo ano foi nomeada de *Saccharomonas sp.* e em seguida, foi denominada *Zymomonas anaerobia* (VIAKARI; KORHOLA, 1986).

No Brasil a pesquisa com *Z. mobilis* foi iniciada em 1952 com Gonçalves de Lima, quando trouxe do México a linhagem AG11. Em 1970 foram isoladas as linhagens CP1, CP2, CP3 e CP4 de amostras de caldo de cana-de-açúcar ligeiramente degradados. A linhagem conhecida como CP4 foi mundialmente distribuída e tem sido detectada como contaminante nas indústrias de fermentação alcoólica (ABUD, 2005).

Z. mobilis é uma bactéria Gram negativa, com 2-6 µm de comprimento e 1-1.5 µm de largura. Normalmente estas bactérias apresentam-se aos pares, mas também podem ser encontradas isoladamente (SWINGS; DE LEY, 1977). As colônias geralmente apresentam-se de coloração branca ou creme quando utilizado meio rico para o crescimento. A temperatura ideal para o crescimento fica em torno de 28°C a 30°C. *Z. mobilis* é um microrganismo etanologênico natural, que possui várias características industriais desejáveis (MORAIS *et al.*, 1993).

O pH ótimo para o crescimento celular de linhagens de *Z. mobilis* ocorre na faixa de 3,5 a 7,5. Muitas linhagens crescem em pH 3,5 e 4, caracterizando-a como acidófila, igualmente como ocorre com as bactérias acéticas, que apresentam habilidade de crescimento em valores de pH entre 4 e 4,5 (SWINGS; DE LEY, 1977, SCHMIDT *et al.*, 1986, ERZINGER; VITOLO, 2006) .



Figura 1. Células de *Z. mobilis*. K. M., PAPPAS, 2010.

Atualmente o microrganismo que mais tem sido utilizado como biocatalisador industrial para produção de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por ser um microrganismo robusto, eficiente e ter um histórico fermentativo. Porém existem outros microrganismos fermentativos que podem ser explorados para produção de etanol, como é o caso da bactéria *Z. mobilis*. Esse microrganismo tem-se mostrado com maior capacidade de produção de etanol quando comparado a *S. cerevisiae* (JEFFRIES, 2005). Na Tabela 1, observa-se as principais diferenças de consumo de glicose, produção de etanol, tolerância ao etanol, produção de biomassa e metabolismo energético entre *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*.

Z. mobilis utiliza uma pequena fração de açúcar como fonte de carbono para produção de biomassa, sendo aproximadamente 98% destinados à fermentação e apenas

2% para o crescimento. Por apresentar um alto potencial fermentativo, *Z. mobilis* apresenta uma produção de etanol, comparável ou até mesmo superior à produção obtida por leveduras (DOELLE et al., 1993, KANNAN; SANGILYANDI; GUNASEKARAN, 1998, YANASE et al., 1992). A rápida e elevada produção de etanol por *Z. mobilis* é atribuída à presença de duas enzimas muito importantes na via ED, a enzima álcool desidrogenase (adh) e a piruvato descarboxilase (pdc) (SEO et al., 2005b).

Tabela 1. Comparação da capacidade de produção de etanol entre *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*

Parâmetro	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
S: açúcar inicial (%)	100	100
P: final (etanol g/L)	41,6	35,2
X: biomassa final (g/L)	1,75	5,00
Y p/s: rendimento de etanol (g/g)	0,43	0,38
qp: taxa específica de produtividade de etanol (g/g/h)	1,55	0,52
Qp: produtividade volumétrica de etanol (g/g/h)	0,87	0,73
μ : taxa de crescimento específico (h ⁻¹)	0,03	0,04
Y x/s: produção de biomassa	0,02	0,005
Qs: absorção de substrato específico (g/g/h)	3,23	1,27
E: rendimento teórico (%)	81,20	68,70
Tolerância ao etanol de cepas tipo selvagem (%)	12	<10 entre 1-2 retarda o crescimento
Metabolismo Energético	ED ^a	TCA ^a EMP ^a e TCA ^a

ED – Via glicolítica de Entner-Doudoroff; EMP – Via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas; TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico. (ROGERS et al., 2007b), com modificações.

A bactéria *Z. mobilis* é um microrganismo interessante na produção de etanol por apresentar uma tolerância de concentração de etanol de até 12%, considerada uma alta quando comparada a outros organismos como *S. cerevisiae*; também possui tolerância natural a muitos compostos inibitórios encontrados em hidrolisados derivados de biomassa lignocelulósica (ROGERS *et al.*, 2007b).

Z. mobilis também pode ser utilizada na fabricação de bebidas fermentadas como o leite fermentado e em processos de industrialização de bebidas tradicionais como Pulque (LEIGH; SCOPEL; ROGERS, 1984).

Embora as linhagens do tipo selvagem de *Z. mobilis* sejam conhecidas por possuir uma estreita faixa de utilização de substrato e utilizarem apenas hexoses (C6), glicose e frutose, e o dissacarídeo sacarose; linhagens recombinantes têm sido desenvolvidas, por engenharia metabólica estendendo a variedade de substratos para permitir a fermentação de pentoses (C5), tais como xilose e arabinose (DEANDA *et al.*, 1996).

Estudos têm sido realizados no Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL Golden, USA) para construção de cepas recombinantes de *Z. mobilis* para serem capazes de usar pentoses, xilose e arabinose, como substratos e assim abrirem novas oportunidades para o mercado de etanol celulósico (ROGERS *et al.*, 2007b, NREL Golden, USA 2015).

O primeiro genoma da linhagem *Z. mobilis* foi sequenciado no ano de 2005 por Seo, Chong, Park, *et al.* (2005). Foi definido que *Z. mobilis* possui um único cromossomo circular contendo 2.056.416 pb com um teor médio de G + C de 46,33%. O genoma de *Z. mobilis* possui um total de 1998 ORFs (Open Reading Frame – janela de leitura aberta), os quais cobrem 87% do genoma, e cada ORF tem um comprimento médio de 898 pb. Entre estes, 1.346 (67,4%) poderiam ser atribuídas a funções putativas, 258 (12,9%) correspondem a sequências de codificação hipotéticas conservadas de função desconhecida e os 394 restantes (19,7%) não apresentavam semelhança com genes conhecidos. As funções das ORFs previstas foram categorizadas por comparação com o banco de dados COG (*Clusters of Orthologous Groups*). Em 2009, a anotação do genoma de *Z. mobilis* ZM4 foi atualizada e em 2018 foi atualizada novamente (CHEN *et al.*, 2018). Os autores identificaram um genoma composto por um único cromossomo circular e quatro plasmídeos com 2,06 Mpb aproximadamente, 1819 genes, 3 regiões para transcrição de RNA ribossomal (16S, 23S e 5S) e também 51 regiões codificadoras de RNA transportador (SEO *et al.*, 2005a; YANG *et al.*, 2009). Os genes essenciais de *Z.*

mobilis são os que estão relacionados ao metabolismo de carboidratos, replicação, transcrição e tradução e esses genes apresentam-se conservados entre as diferentes linhagens (CHEN *et al.*, 2018).

No sequenciamento do genoma de *Z. mobilis* foram identificados por SEO *et al.*, 2005, três fatores sigma 70, um sigma 54 e um sigma 28. Também foram identificados outros dois fatores sigma, um sigma 24 e um sigma 32, porém as funções desses dois fatores não estão ainda bem definidas. Em seu estudo SEO *et al.*, 2005, afirma que o genoma das linhagens ZM4 e ZM1 são muito semelhantes, porém, ZM4 possui algumas sequências que não estão presentes em ZM1 e que ZM4 é mais tolerante a concentrações de etanol mais altas do que a cepa ZM1 e que ZM4 apresenta maiores taxas específicas de crescimento, produção de etanol e absorção de glicose (SEO *et al.*, 2005).

Vários tipos de fatores ambientais podem influenciar negativamente no crescimento das células de *Z. mobilis* e com isso interferir na produção de etanol. As altas concentrações de etanol (acima de 12%), pressão osmótica e estresse oxidativo são interferentes significativos na taxa de crescimento e na viabilidade das células de *Z. mobilis*, bem como na produção de etanol. Para entender melhor essas limitações, é essencial obter amostras de *Z. mobilis* mutantes que possuam tolerância ao estresse (TAN *et al.*, 2016a).

Z. mobilis possui a capacidade de realizar algumas alterações na composição da membrana lipídica, evitando assim a penetração de etanol na célula, aumentando as propriedades da barreira hidrofóbica e diminuindo a perda de material intracelular. Quando os níveis alcançam o máximo tolerável, o álcool atua na dissolução da membrana citoplasmática, que é de composição fosfolipídica, afetando a fluidez e aumentando a permeabilidade, resultando no fluxo de íons, cofatores e coenzimas para o meio extracelular (SCHMIDT *et al.*, 1986).

O fator sigma 70 também pode desempenhar um papel importante na resistência de *Z. mobilis* a alta concentração de etanol. Sabe-se que subunidade sigma da RNA polimerase é fundamental para o reconhecimento do promotor e assim dar início ao processo de transcrição. Mutações no fator sigma podem alterar a preferência da RNA polimerase pelo promotor, afetando os níveis transcricionais e mudando o transcriptoma (TAN *et al.*, 2016b).

Z. mobilis está sendo estudada em níveis básico e aplicado, o que servirá de base para a biotecnologia industrial no futuro. Além disso, *Z. mobilis* tem sido modificada por mutagênese (CANDY; DUGGLEBY, 1998; WANG *et al.*, 2016; POHL *et al.*, 1998;

TYPAS; GALANI, 1992), evolução adaptativa (HE *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2019; FUCHINO; BRUHEIM, 2020), knock-out de genes específicos (VELMURUGAN; INCHAROENSAKDI, 2020; WU *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2018) e engenharia metabólica (WANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2014; KALNENIEKS; BALODITE; RUTKIS 2019; RUTKIS *et al.*, 2014; QIU *et al.*, 2020) para melhorar a produção de bioetanol a partir de biomassa.

A viabilidade de produção, de compostos químicos como sorbitol, ácido biônico, levana, ácido succínico, isopropanol e isobutanol e as estratégias para melhoria na produção destes compostos, estão sendo desenvolvidos usando *Z. mobilis* como plataforma industrial inovadora para futuras biorefinarias (HE; FENG; ZHANG, 2008).

1.2 Metabolismo de *Z. mobilis*

Z. mobilis é uma bactéria que tem apresentado grande potencial para a produção industrial de diversos produtos, um deles o etanol. Por apresentar expressivo rendimento de etanol, *Z. mobilis* chamou a atenção dos pesquisadores, onde em seus estudos buscaram elucidar como ocorre de fato a formação de etanol por esse microrganismo. Os pesquisadores concluíram que *Z. mobilis* utiliza uma via diferente da via clássica utilizada pela maioria das bactérias a via *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) (GIBBS; DEMOSS, 1951)

A via metabólica utilizada por *Z. mobilis* é a via *Entner-Doudoroff* (ED) (ENTNER; DOUDOROFF, 1952) (Figura 2), assim como em algumas bactérias Gram negativas, incluindo *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium* (SPRENGER, 1996). Nesta via metabólica uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato por meio da formação de 2-ceto-3-deoxi-6- fosfogluconato como intermediário chave. Esse processo foi confirmado por estudos com C14 (GIBBS; DEMOSS, 1954) e por evidências enzimáticas (DAWES; RIBBONS; LARGE, 1966), onde foram demonstradas as atividades das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, etanol desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, glucoquinase e piruvato descarboxilase. Em *Z. mobilis* a glicose só pode ser metabolizada pela via ED, pois não há gene codificador para a enzima 6-fosfofrutoquinase em seu genoma (SEO *et al.*, 2005).

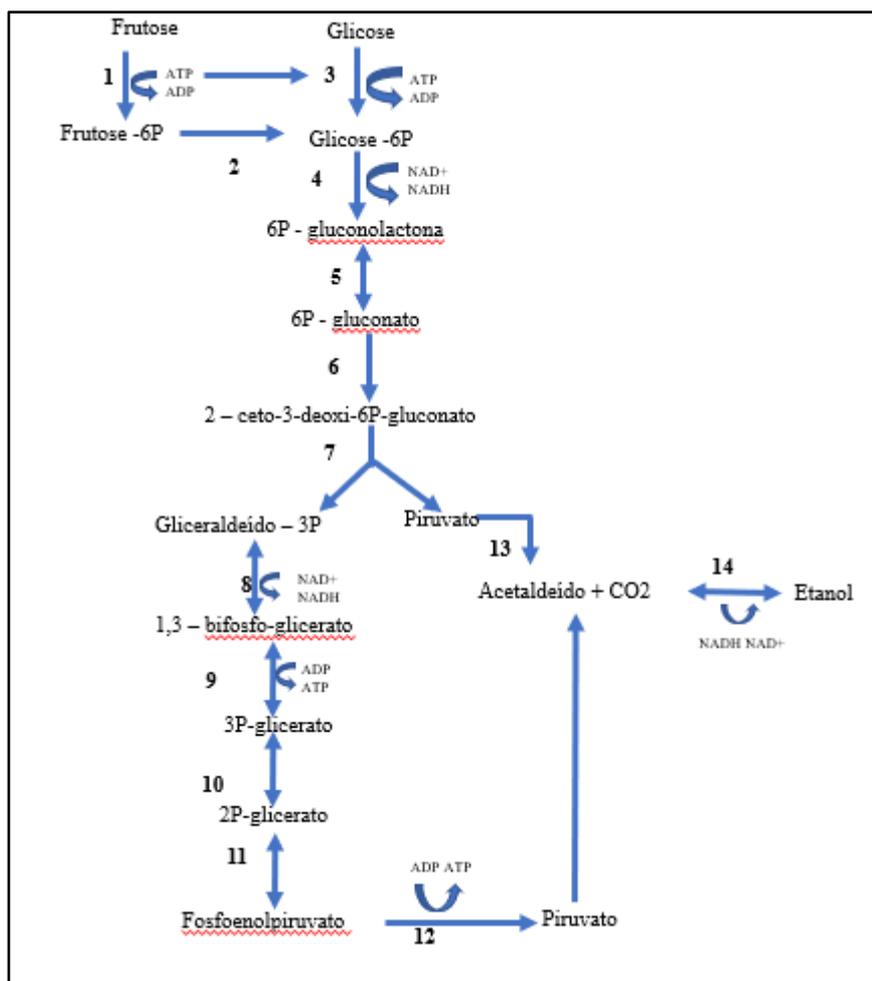


Figura 2. Via metabólica ED em *Z. mobilis*, Herrera *et al.*, (2021), com modificações. 1: frutoquinase, 2: glicose-6P isomerase, 3: glicoquinase, 4: glicose – 6P desidrogenase, 5: gluconolactona hidrolase, 6: fosfogluconato desidratase, 7: 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolase, 8: gliceráldeído-3P desidrogenase, 9: fosfoglicerato quinase, 10: fosfoglicerato mutase, 11: enolase, 12: piruvato quinase, 13: piruvato descarboxilase, 14: álcool desidrogenase.

A via ED é uma alternativa à via glicolítica EMP, as reações envolvem a clivagem de 2-ceto-3-deoxi-6- fosfato-gluconato para gerar gliceráldeído-3-fosfato e piruvato ao invés da clivagem de frutose-1,6-bifosfato em gliceráldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. A conversão de gliceráldeído-3-fosfato a piruvato são comuns às duas vias. Na via ED ocorre a formação de apenas uma molécula de gliceráldeído-3-fosfato, assim, essa via gera apenas 1 mol de ATP por mol de glicose ao invés de 2 mols de ATP gerados pela via EMP. A via ED possivelmente é uma via glicolítica menos eficiente e mais primitiva evolutivamente (CONWAY, 1992).

Embora *Z. mobilis* possua seu metabolismo composto por uma via energeticamente menos eficiente do que a via EMP, é capaz de manter um rápido fluxo de carbono, facilitado pelo alto nível de expressão das enzimas da via glicolítica, que compõem cerca de 50% do total de proteínas solúveis da célula (CONWAY, 1992).

A bactéria *Z. mobilis* possui taxas específicas de absorção de açúcares e de produção de etanol de três a quatro vezes mais rápidas do que de leveduras, levando a um significativo rendimento de etanol e baixo rendimento celular (ROGERS *et al.*, 1982). Somente 2 a 3% da glicose metabolizada é assimilada na forma de biomassa (BELAUCH; SENEZ, 1965). Por apresentar esta característica de baixo crescimento celular, *Z. mobilis* se torna uma excelente candidata para a síntese de produtos de interesse industrial, sendo que não há muito desvio de carbono para a produção de células.

O expressivo rendimento de etanol e baixo crescimento celular são explicados pelo crescimento desacoplado apresentado por *Z. mobilis*, fenômeno no qual há um rápido catabolismo não relacionado com a síntese de biomassa celular (BELAUCH; SENEZ 1965). O baixo rendimento de ATP da via ED juntamente com a alta expressão das enzimas fermentativas ajudam a explicar a alta taxa metabólica de *Z. mobilis*, de forma que esta produza ATP em uma taxa específica consideravelmente maior do que a encontrada em levedura (KALNENIEKS, 2006)

O fato da alta taxa de síntese de ATP não estar relacionada com a formação de biomassa, juntamente com a sua alta taxa catabólica, apontam para a presença de reações que utilizam ATP desacopladas do crescimento celular. A candidata mais provável para reciclar o excesso de ATP é a F₀F₁-ATPase (KALNENIEKS, 2006), cuja atividade está presente tanto em condições aeróbicas, competindo com a biossíntese de ATP, quanto em condições anaeróbicas (RUTKIS *et al.*, 2014). Portanto, sua atividade pode ser parcialmente responsável pelo crescimento desacoplado, uma vez que a rápida produção de ADP estimularia a glicólise e assim a produção de etanol (REYES; SCOPES, 1991).

O consumo de ATP e suas reações exercem controle sobre o fluxo da via ED e a taxa de consumo de glicose. Quando ocorre o fornecimento de ADP para a glicólise, a ATPase dependente de H⁺ contribui para o alto fluxo glicolítico da via ED (RUTKIS *et al.*, 2016). Porém, a atividade da ATPase não dissipa a energia, mas sim a converte em uma força próton-motiva (Δp) transmembrana. Estudos demonstraram que a quebra de ATP por uma F₀F₁-ATPase está acoplada a um ciclo fútil de prótons na bactéria *Streptococcus bovis*, outro exemplo de crescimento desacoplado (COOK; RUSSELL, 1994). Este processo provavelmente pode estar presente em *Z. mobilis*, no entanto, são

necessários mais estudos para esclarecer a questão do gradiente de prótons em *Z. mobilis*. Uma hipótese pode estar relacionada aos produtos do seu metabolismo, o etanol e o dióxido de carbono, sendo os mais abundantes metabólitos. (KALNENIEKS, 2006).

Mesmo que o etanol acumulado durante a fermentação por *Z. mobilis* cause um vazamento de íons e pequenas moléculas pela membrana, incluindo prótons, ele não pode ser apontado como a causa do crescimento desacoplado, pois a dissipação de energia também ocorre na ausência de etanol no meio (KALNENIEKS, 2006). O CO₂ produzido deixa a célula por difusão passiva, porém parte dele pode ficar no citoplasma sofrendo hidratação catalisada pela anidrase carbônica com a formação de ácido carbônico. Este composto é dissociado no ânion bicarbonato e em um próton. A exportação deste ânion bicarbonato seria uma forma eficiente de reduzir o gradiente de pH transmembrana, uma vez que um próton ficaria dentro da célula (KALNENIEKS, 2006). Este pode ser um fenômeno que pode estar relacionado ao crescimento desacoplado, e mesmo que seja suportado pela presença de anidrase carbônica no genoma de *Z. mobilis* (SEO *et al.*, 2005), também são necessários mais estudos para que isso possa ser confirmado.

Z. mobilis possui um ciclo incompleto do ácido tricarbóxico (TCA), que funciona como duas ramificações, isso foi confirmado por estudos com ¹³C. Esse microrganismo não possui em seu genoma genes para as enzimas α -cetoglutarato desidrogenase e malato desidrogenase (SEO *et al.*, 2005), provavelmente o TCA em *Z. mobilis* deva funcionar apenas para prover precursores para as reações de biossíntese (KALNENIEKS, 2006). A via das pentoses fosfato também é incompleta uma vez que não há atividade de transaldolase. A maioria dos genes desta via não estão presentes no genoma (SEO *et al.*, 2005). O TCA incompleto de *Z. mobilis* promove o potencial do redirecionamento do seu metabolismo, por meio de deleção de genes, para produtos de alto valor agregado ao invés de produzir os produtos finais nativos de *Z. mobilis* como lactato e etanol (ROGERS *et al.*, 2007).

1.3 Promotores

Os promotores são definidos como sequências específicas presentes na molécula de DNA, local da formação dos complexos de início da transcrição. Nos organismos procarióticos, a holoenzima RNA polimerase (RNAP) ($\alpha 1 \alpha II \beta \beta' \omega \sigma$) reconhece sequências de DNA específicas e liga-se para iniciar a transcrição. Porém, a transcrição somente inicia após a formação do complexo RNAP holoenzima, com a participação do fator sigma (MUNIZ, LB; ANDRADE, EV; ASTOLFI-FILHO, 2005).

Em procariotos, o promotor é definido por duas regiões conservadas, localizadas a cerca de 35 e 10 pb *upstream* ao sítio de início da transcrição (regiões -35 e -10, respectivamente) também chamadas de regiões consenso. Em geral, os promotores que possuem sequências iguais ou muito próximas ao consenso são considerados promotores fortes (NEALE *et al.*, 1986). A importância da ligação da RNA polimerase dependente de DNA (RNAP) depende fortemente da estrutura do promotor. Em *E. coli*, estudos indicam que os hexanucleotídeos canônicos nas regiões -35 (TTGACA) e -10 (TATAAT) são importantes para reconhecimento pelo sigma 70 (CARBONELLI *et al.*, 1999).

Pouco se sabe sobre a estrutura de promotores em *Z. mobilis*. Rossi *et al.*, (1986) construíram um cassete de expressão para o gene da cloranfenicol aciltransferase (*cat*) utilizando um promotor sintético contendo a sequência consenso de *E. coli* (pXJ002). Conway, *et al.*, (1987) utilizaram esta construção para transformação de *Z. mobilis* CP4. No entanto, os níveis de expressão de *cat* em CP4 eram 20% do expresso na linhagem HB101 de *E. coli* (CONWAY *et al.*, 1987; ROSSI *et al.*, 1983).

Conway *et al.*, (1987) afirmaram em seus estudos que havia sequências similares de DNA entre *E. coli* e *Z. mobilis* que eram reconhecidas como regiões promotoras em ambos os organismos. Os mesmos autores realizaram estudos com objetivo de sequenciar, verificar e confirmar a funcionalidade do promotor do gene da piruvato descarboxilase (*Ppdc*) de *Z. mobilis* em *E. coli* (CONWAY *et al.*, 1987a). Para isso, foi construída uma biblioteca genômica de *Z. mobilis* CP4 no plasmídeo pUC18 e identificados os plasmídeos que continham o gene *pdc* completo em diferentes orientações. Foi observada expressão em *E. coli* quando o cassete de expressão foi posicionado na mesma orientação do promotor *lacZ* presente no pUC18. No entanto, quando a orientação do cassete de expressão foi invertida, não foi observada atividade de piruvato descarboxilase. Portanto, os autores concluíram que o *Ppdc* de *Z. mobilis* não foi reconhecido pelo aparato de transcrição de *E. coli*. Análises mostraram que não havia homologia entre as sequências -10 e -35 de *Z. mobilis* com as respectivas sequências de *E. coli*. A técnica de *primer extension* identificou um único transcrito, cujo primeiro nucleotídeo era uma guanina localizada a 37 pb *upstream* do primeiro códon de iniciação da tradução, confirmando que o *pdc* de *Z. mobilis* é composto por uma única região promotora (CONWAY *et al.*, 1987b).

Neale, *et al.* (1987) clonaram o gene *pdc* da linhagem ZM6 de *Z. mobilis* e realizaram experimentos similares aos de Conway, *et al.*, (1987b), obtendo os mesmos resultados. Ao analisar 200 pb da região promotora do gene *pdc* de ZM6, os autores

identificaram as possíveis regiões -10 e -35, e confirmaram que não havia homologia com as regiões consenso de *E. coli*. Ambos os autores não foram capazes de determinar a sequência do sítio de ligação da RNA polimerase do promotor *pdc* de *Z. mobilis* (NEALE *et al.*, 1987).

Conway, *et al.*, (1987) propuseram *in silico* as prováveis regiões consenso entre os promotores dos genes codificadores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Pgap*), piruvato descarboxilase (*Ppdc*) e álcool desidrogenase B (*PadhB*). As regiões -10 e -35 foram propostas baseadas na afirmação preconcebida de que havia semelhança entre os promotores de *Z. mobilis* e *E. coli*. Porém, Barnell, *et al.* (1992) afirmaram que as sequências propostas não eram válidas. Os autores alinharam os promotores em 115 posições a partir do sítio de iniciação transcricional (TSS) e foram observadas homologia entre 49,5% a 64,3%, entre os promotores *gap* e *adhB* (CONWAY, T., SEWELL, G.W., INGRAM, 1987).

Não houve consenso com promotores de outras bactérias, porém foram encontradas regiões conservadas entre os promotores altamente expressos; a primeira região conservada TAGANN foi localizada entre as posições -3 e -11, a partir do TSS. Uma segunda região conservada WAAWA (W indica A ou T) contendo 41 bases conservadas foi localizada através de análise de bioinformática, essa mostrou-se independente da primeira sequência identificada. Não foi observada homologia nos promotores de genes pouco expressos. No entanto, estas sequências conservadas não foram confirmadas experimentalmente (BARNELL *et al.*, 1992; CONWAY; SEWELL; INGRAM, 1987).

A enzima álcool desidrogenase de *Z. mobilis*, codificada pelo gene *adh*, apresenta duas isoenzimas, a álcool desidrogenase I (*AdhA*) e a álcool desidrogenase II (*AdhB*). Portanto, são dois genes que codificam para as duas isoenzimas, sendo que a *AdhA* é dependente de zinco, comumente encontrado em bactérias, e a *AdhB* é dependente de ferro mais encontrada em eucariotos (CONWAY, T., SEWELL, G.W., INGRAM, 1987). Segundo Conway, *et al.* (1987), a enzima *AdhII* é uma das mais abundante em *Z. mobilis*.

Utilizando a técnica de *primer extension* para a região *upstream* do gene *adhB* (CONWAY *et al.*, 1987a; CONWAY *et al.*, 1987a), os autores identificaram dois sítios de iniciação da transcrição (TSS) e concluíram que o gene *adhB* possui dois promotores denominados de P1 e P2. Ambos os promotores não apresentaram homologia com as sequências consenso de *E. coli*. A região -10 dos dois promotores putativos possuíam sequências distintas, enquanto que, as regiões -35 eram similares entre eles. Ao verificar

a funcionalidade de P1 e P2 em *E. coli*, observou-se que apenas o promotor P1 era funcional. Assim, os autores concluíram que como o *Ppdc*, o promotor *PadhB* de *Z. mobilis* não é funcional em *E. coli* (CONWAY et al., 1987c).

Inicialmente, Conway e L.O. Ingram, (1987) e Eddy, et al. (1989), sugeriram que os genes *gap* e *pgk* de *Z. mobilis* (CP4) formassem um único *operon*. Foram encontradas duas prováveis regiões *Shine-Dalgarno* (SD), uma *upstream* ao gene *gap* e a segunda localizada no início do códon de tradução de *pgk*. Todos os genes apresentaram códons preferenciais, e com isso, forte expressão dos genes, que apresentam regiões ricas em A+T em torno da sequência *Shine-Dalgarno*, propiciando uma eficiente ligação ribossomal. Provavelmente, o uso combinado de códons preferenciais pelos genes *pgk*, *gap*, *adhB* e *pdh*, que são altamente expressos em *Z. mobilis*, sejam responsáveis pelos diferentes tipos de tRNA (CONWAY et al., 1987c; CONWAY; SEWELL; INGRAM, 1987; EDDY et al., 1989).

Eddy et al., (1989) verificou que as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh) e fosfoglicerato quinase (Pkg) participam igualmente das reações sequenciais na glicólise, fazendo parte de um mesmo *operon*, e regulados pelo mesmo promotor. Porém, a taxa catalítica de Pkg é 4 vezes a de Gapdh, sendo necessárias 4 vezes mais moléculas de Gapdh para igualar a atividade entre as enzimas. É provável que existam regiões reguladoras adicionais associadas com os genes *gap* e *pgk* de *Z. mobilis* que reduzam a produção de Pkg (EDDY et al., 1989).

No entanto, estudos mais recentes, com a realização de análises transcriptômicas mostraram que o gene *pgk* apresenta um promotor próprio e não faz parte do *operon gap*, bem como, o gene *gap* apresenta seu próprio promotor e um terminador fraco, o que implica na diferença de atividade de *gap* e *pgk* (VERA, J. M., et al., 2020). A presença do mRNA de 6,4 kb englobando os dois genes ocorreria devido a presença do terminador fraco entre eles que permitiria a transcrição livre de *gap* para *pgk* (VERA, J. M. et al., 2020).

Conway et al., (1992) observaram através de ensaio enzimático e eletroforese em gel de poliácridamida e dodecil sulfato de sódio, um simples padrão de restrição no gene da enolase (*eno*), indicando que este gene está presente em cópia única no genoma de *Z. mobilis*. Os genes glicolíticos de *Z. mobilis* possuem sítios canônicos de ligação ao ribossomo, com exceção do gene *eno*, este gene foi analisado *in silico* e não foi possível determinar um terminador transcricional forte. Portanto, é provável que a abundância de enolase em *Z. mobilis* esteja relacionada a altos níveis de mRNA, uma alta taxa de

tradução ou a resistência da enzima a proteólise (BURNETT; LIU; CONWAY, 1992; YANG *et al.*, 2019a).

Recentemente, foi realizado estudo para caracterização dos promotores de *Z. mobilis* quanto à sua força, utilizando a linhagem ZM4. Os promotores foram identificados anteriormente quanto a sua força através de conjuntos de dados de biologia de sistemas e após, um sistema de genes repórter duplo foi desenvolvido, utilizando os genes *eGFP* e *opm-Cherry* no mesmo vetor, sendo avaliado por citometria de fluxo. O promotor constitutivo PlacUV5 foi utilizado para controlar o gene repórter *opm-Cherry*, para calibração do sistema, enquanto o gene repórter *eGFP* era controlado pelos candidatos a promotores de *Z. mobilis*. Observou-se correlação entre os resultados projetados *in silico* e os resultados experimentais. Foram identificados 38 promotores, dos quais, 19 foram classificados como fortes, 9 como intermediários e 10 como fracos. Através das análises experimentais realizadas, foi possível confirmar os dados obtidos *in silico*, confirmando que os promotores *eno*, *gap*, *pdh* e *adhB* são promotores fortes em *Z. mobilis* (YANG *et al.*, 2019b). Na Tabela 2 estão alguns promotores de *Z. mobilis* caracterizados e classificados por YANG *et al.*, (2019a) conforme a força do promotor.

Utilizando o sistema de gene repórter duplo, foi possível caracterizar os promotores em condições de crescimento natural, estresse por etanol e condições induzidas por etanol, com isso, foi possível investigar a força transcricional pela indução com etanol. Foi possível identificar três promotores responsáveis em conduzir a expressão de genes nativos de *Z. mobilis*, esses são promotores responsivos ao etanol e podem estar relacionados ao crescimento. Portanto, esses promotores são partes biológicas, que podem ser usados para sincronizar a expressão de genes da via heteróloga com o processo de produção de etanol por *Z. mobilis* (YANG *et al.*, 2019a).

Tabela 2. Promotores de *Z. mobilis* caracterizados e classificados conforme sua força, conforme Yang *et al.*, (2019a).

Gene	Nome do gene	Função do gene
Promotores fortes		
ZMO0177	<i>Gap</i>	Gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase tipo I
ZMO1360	<i>Pdc</i>	Proteína tiamina pirofosfatase TPP
ZMO0516	<i>Tuf</i>	Elongação do fator Tu

ZMO1608	<i>Eno</i>	Fosfopiruvato hidratase
ZMO0997	<i>Eda</i>	2-dehidro-3-deoxifosfogliconato aldolase/4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolase
ZMO0367	<i>Zwf</i>	Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase
ZMO0689	<i>Gfo</i>	Oxidoredutase
ZMO1596	<i>adhB</i>	Contendo ferro – álcool desidrogenase
Promotores médios		
ZMO1351	<i>clcD1</i>	Carboximetilenobutenolidase
ZMO0056	<i>Glms</i>	Glicosamina frutose 6-fosfato aminotransferase
ZMO0570	<i>prmA</i>	Ribossomal L11 metiltransferase
Promotores fracos		
ZMO1980	<i>gldB</i>	Metiltransferase GidB
ZMO1194	<i>dprA</i>	Proteína protetora de DNA DprA
ZMO0005	<i>Cys-D</i>	Sulfato adeniltransferase subunidade 2

(YANG *et al.*, 2019a), com adaptações. ND – não determinado

Os resultados e as metodologias utilizadas por Yang *et al.*, (2019a) em estudos anteriores foram utilizados para a identificação de possíveis promotores de *Z. mobilis* induzíveis por etanol. Foram avaliados os promotores que foram inibidos ou ativados por etanol, sendo selecionados quatro promotores que apresentaram regulação pela presença de etanol (P0037, P0038, P0405 e P0435). Com o promotor P0037, foi observada uma diminuição da expressão na presença de etanol, indicando uma ação inibitória do etanol. Já os promotores P0405, P0435 e P0038 foram ativados e tiveram maior expressão na fase estacionária, mostrando que seriam candidatos induzíveis por etanol (YANG *et al.*, 2019b).

No mesmo trabalho, ao analisar as sequências dos promotores ZMO405, ZMO0038 e ZMO0435, os autores observaram possíveis elementos responsivos ao etanol como a sequência GGGGCT presente nos três promotores. As regiões -10 e -35 foram indicadas através do *software* Bprom (promoter predictor), onde a provável região responsiva ao etanol (GGGGCT) estava localizada upstream à região -35 putativa de

PO405 e *downstream* à possível região -10 de PO038. No entanto, esses resultados precisam ser melhor investigados (YANG *et al.*, 2019b).

Recentemente, Vera *et al.*, (2020), através de análises estatísticas e de RNA-seq, afirmou que, embora ZM4 possua um genoma pequeno (~2Mb) e um metabolismo simplificado, sua organização transcricional é complexa. Os resultados desse estudo apontam que ZM4 exibe complexidade transcricional semelhante aos transcriptomas bacterianos mais complexos, apresentando promotores múltiplos por gene ou operons, promotores internos em operons, transcritos anti-senso e não codificadores. Os sinais de terminação intrínseca observados em ZM4 foram semelhantes aos de *E. coli*, bem como a presença de um grande número de TSSs intragênicos e anti-senso, sugerindo que ZM4 expressa RNAs não codificadores a partir de unidades transcricionais, com densidades genômicas semelhantes as de *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Com os dados de 3940 TSSs distintos obtidos por TSS-seq, foi caracterizado o elemento sigma A (σ^A). Esse é o fator de manutenção sigma, responsável pela maior parte da iniciação transcricional em bactérias e é ortólogo do fator σ^{70} sigma 70 de *E. coli*, que teria como sequências consenso -35 e -10 TTGNNN e TANNN, respectivamente. A sequência entre o TSS e o hexâmero -10 indicada foi de 6 pb (“discriminador”), e o comprimento do espaçador foi de 17 pb (sequência entre -35 e -10 hexâmeros) (VERA, J. M. *et al*, 2020).

Os genes de ZM4 altamente expressos não apresentaram dependência de uma T₋₇ (regiões altamente conservadas) ou de qualquer base nesta posição, ao contrário dos promotores de *E.coli*, em que T₋₇ contribui para a força do promotor. Portanto, o consenso do promotor reconhecido pelo fator σ^A de ZM4 possui algumas características semelhantes às das bactérias utilizadas como modelo, como *E. coli* e *Bacillus subtilis*, porém, difere no principal elemento, a região – 10 do promotor (VERA, J. M. *et al*, 2020).

Os principais promotores utilizados para expressão heteróloga, engenharia metabólica e engenharia genética são os promotores fortes de *Z. mobilis* como P_{gap}, P_{pdC} e P_{adhB}. Alguns exemplos da utilização desses promotores estão detalhados em diversos estudos para expressão heteróloga de diferentes proteínas como, L-alanina desidrogenase (UHLENBUSCH; SAHM; SPRENGER, 1991), enzimas celulolíticas(LINGER; ADNEY; DARZINS, 2010), fosfomanose-isomerase (WEISSER; KRÄMER; SPRENGER, 1996), glicosil-hidrolase (KURUMBANG *et al.*, 2020), transportador específico da xilose - XylE (AGRAWAL; MAO; CHEN, 2011), acetolactato sintetase, acetolactato descarboxilase e butanodiol desidrogenase (YANG *et al*, 2016),

endoglucanase e xilanase (TODHANAKASEM *et al*, 2019) desidrogenase oxidativa (YI; GAO; BAO, 2019).

Apesar de todos os estudos já realizados sobre os promotores de *Z. mobilis*, não há dados experimentais conclusivos que confirmassem o sítio de ligação de σ^A nos promotores de *Z. mobilis*. Até o momento, não existem dados conclusivos sobre as regiões ativadoras ou não dos promotores analisados de *Z. mobilis*. Através da literatura analisada fica evidente que normalmente o tamanho dos promotores utilizados nos estudos ficam entre 150 a 300 pb.

1.4 5' UTR (*Untranslated Region*)

Os 5'UTR (*Untranslated Region*) bacterianos são elementos que contribuem para a regulação gênica principalmente nas situações de alterações ambientais. Eles possuem a capacidade de detectar e responder rapidamente a essas alterações. Portanto, regulam as mudanças na expressão gênica e na atividade proteica (CHO *et al.*, 2017).

Vários elementos reguladores foram descobertos em diferentes espécies bacterianas, como riboswitches e 5'UTR. Em *Z. mobilis*, estão previstos alguns *riboswitches* em seu genoma, porém, essa previsão foi realizada por análises computacionais, não confirmadas experimentalmente. Para identificar e caracterizar os 5' UTR responsivos a etanol em ZM4, Cho, *et al.*, (2017), utilizaram a metodologia de gene repórter eGFP. Dois candidatos apresentaram alterações significativas de fluorescência sob suplementação de 5% de etanol comparado com o controle sem adição de etanol: o 5'UTR de ZMO0347 (proteína de ligação de RNA Hfq, UTR_ZMO0347) e o 5'UTR do ZMO1142 (tiorredoxina redutase, UTR_ZMO1142) ambos responsivos ao estresse por etanol. Para UTR_ZMO1142, foi observado efeito regulatório sob condições de suplementação mais elevada de etanol, xilose e acetato, indicando-o como um regulador potencial de resposta geral ao estresse (CHO *et al*, 2017).

Sabe-se que existem múltiplos sRNAs (*small RNAs*) em *Z. mobilis* que participam na via metabólica de produção de etanol. Estudos recentes realizados por Han *et al.*, (2020) identificaram dois importantes sRNAs, Zms4 e Zms6, sendo ambos positivamente regulados sob estresse de etanol. Os sRNAs identificados se ligam entre si, assim como outros sRNAs, formando uma rede direta de interação entre sRNA-sRNA. Os resultados desse estudo sugerem que os mRNA alvos são regulados por Zms4 e Zms6 por meio das

regiões 5' UTR ou pelas regiões próximas ao códon de início da tradução (HAN *et al.*, 2020).

Embora existam estudos desde a década de 1980 que buscam elucidar as regiões de início do processo de transcrição em *Z. mobilis*, tais elementos ainda não foram totalmente definidos. A determinação destas sequências tem importância na ciência básica e aplicada, uma vez que o conhecimento destas regiões traz alternativas de manipulação genética de *Z. mobilis*. Confirmando que *Z. mobilis* é um microrganismo promissor para a indústria química e energética, este estudo irá trabalhar na definição das sequências promotoras de início do processo de transcrição que são de fundamental importância para a inovação biotecnológica.

2.0 Objetivo geral

Caracterizar o promotor do gene piruvato descarboxilase (*pdc*) de *Zymomonas mobilis*.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar o tamanho mínimo funcional do promotor *pdc* por meio da intensidade de fluorescência de *eGFP*;
- Avaliar as possíveis regiões de ligação das subunidades sigma 70 no promotor *pdc* de *Z. mobilis*;
- Identificar regiões de regulação do promotor *pdc*.

3.0 Materiais e Métodos

3.1 Micro-organismos e plasmídeos utilizados

As linhagens bacterianas e os plasmídeos que foram utilizados e desenvolvidos nesse trabalho estão nas **Tabelas 3 e 4**, respectivamente. A linhagem de *Z. mobilis* ZM4 foi adquirida na ATCC (EUA) e o plasmídeo pBBR1MCS foi doado pelo professor Henrique Ferreira (UNESP Rio Claro).

Tabela 3. Micro-organismos utilizados

Linhagens	Características e/ou genótipos	Utilização	Referência
<i>Z. mobilis</i> ZM4 ATCC31821	Selvagem	Transformação com diferentes plasmídeos	(LINDNER, 1928)
<i>E. coli</i> DH5alpha ATCC47093	<i>F</i> ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> ϕ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> <i>hsdR17</i> λ ⁻	Clonagem de DNA	(YANISCH-PERRON, VIEIRA, MESSING, 1985)
<i>E. coli</i> XL10 Gold	<i>TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]</i>	Clonagem de DNA	<i>Stratagene, EUA</i>
<i>E. coli</i> JM110 ATCC47013	<i>rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [<i>F' traD36 proAB lacIqZ</i> Δ <i>M15</i>]	Desmetilação de plasmídeos	(YANISCH-PERRON, VIEIRA, MESSING, 1985)
ZM P <i>pd</i> c ₅₀₅	Contendo plasmídeo pB1PDC com promotor <i>pd</i> c com 505 pb	Testar a força do promotor	Nesse trabalho

Tabela 3. Continuação

Linhagens	Características e/ou genótipos	Utilização	Referência
ZM <i>Ppdc</i> ₄₀₅	Contendo plasmídeo pB1PDC com promotor <i>pdc</i> com 405 pb	Testar a força do promotor	Nesse trabalho
ZM <i>Ppdc</i> ₃₀₅	Contendo plasmídeo pB1PDC com promotor <i>pdc</i> com 305 pb	Testar a força do promotor	Nesse trabalho
ZM <i>Ppdc</i> ₁₉₇	Contendo plasmídeo pB1PDC com promotor <i>pdc</i> com 197 pb	Testar a força do promotor	Nesse trabalho
ZM <i>Ppdc</i> ₁₄₆	Contendo plasmídeo pB1PDC com promotor <i>pdc</i> com 146 pb	Testar a força do promotor	Nesse trabalho
D	Contendo plasmídeo pB1PDC somente com eGFP, sem <i>Ppdc</i> ₅₀₅ pb	Controle negativo	Nesse trabalho
PV	Contendo plasmídeo pB1PDC vazio	Controle negativo	Nesse trabalho
V2	Contendo plasmídeo pB1PDC somente com <i>Ppdc</i> ₅₀₅ pb, sem E _{gfp}	Controle negativo	Nesse trabalho
5UTR	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , região -10 original e 5'UTR	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
RI	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , contendo a região intermediária entre -10 e -35	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
RI mutada	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , com região	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho

	intermediária entre -10 e -35 mutada		
C1	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , com regiões -10 e -35 mutadas	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
C2	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , com regiões -35 mutada e -10 original	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
C3	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , com regiões -35 e -10 originais	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
C4	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , com região -10 mutada e -35 original	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
N1	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , com fragmento de <i>Ppdc</i> ₁₉₇ e <i>Ppdc</i> ₃₀₅ com região regulatória	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
N2	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₇₉ , com fragmento de <i>Ppdc</i> de 79 pb	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
N3	Com plasmídeo pB1PDC <i>Ppdc</i> ₁₄₆ , com fragmento obtido através de software PePPER	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho
5 UTR	Com plasmídeo pB1PDC contendo somente a região 5'UTR	Identificar região -10 e -35 e início da transcrição	Nesse trabalho

Tabela 4. Plasmídeos utilizados

Plasmídeos	Características	Referências
pBBR1MCS1 (cloranfenicol), CM ^R	Origem de replicação para amplo espectro de hospedeiros. CM ^R	(KOVACH et al., 1994)
pB1PDC	pBBR1MCS1 com o gene eGFP sob o controle do promotor <i>Ppdc</i> ₅₀₅ e do terminador <i>Tpdc</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM4. CmR	Nesse trabalho
pB1PDC ₄₀₅	pBBR1MCS1 com o gene eGFP sob o controle do promotor <i>Ppdc</i> ₄₀₅ e do terminador <i>Tpdc</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM4. CmR	Nesse trabalho
pB1PDC ₃₀₅	pBBR1MCS1 com o gene eGFP sob o controle do promotor <i>Ppdc</i> ₃₀₅ e do terminador <i>Tpdc</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM4. CmR	Nesse trabalho

Tabela 4. Continuação

Plasmídeos	Características	Referências
pB1PDC ₁₉₇	pBBR1MCS1 com o gene eGFP sob o controle do promotor <i>Ppdc</i> ₁₉₇ e do terminador <i>Tpdc</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM4. CmR	Nesse trabalho
pB1PDC ₁₄₆	pBBR1MCS1 com o gene eGFP sob o controle do promotor <i>Ppdc</i> ₁₄₆ e do terminador <i>Tpdc</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM4. CmR	Nesse trabalho

3.2 Meios de cultura e cultivo celular

Todas as soluções e meios de cultura foram preparados com água destilada ou MilliQ. Quando necessário esterilizar, foram submetidos à autoclave a 121°C por 20 minutos. O material plástico e as vidrarias estéreis foram submetidas ao mesmo processo de esterilização por 40 minutos. Algumas soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração usando-se membranas tipo Millipore com poro de 0,22 µm.

- **Meio Lúria – Bertani (LB) pH 7,2**

Extrato de levedura 5,0 g/L

Peptona de caseína 10,0 g/L

NaCl 10,0 g/L

Para o meio sólido foram adicionados 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico. O pH foi corrigido com solução de NaOH 4M.

- **Meio Rico (RM) pH 6,0**

Extrato de levedura 10,0 g/L

KH₂PO₄ 2,0 g/L

Glicose 10,0 a 180,0 g/L

MgSO₄.7H₂O 1,0 g/L

(NH₄)₂SO₄ 1,0 g/L

Para o meio sólido foram adicionados 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico. O pH foi corrigido com solução de KOH 4M.

- **Meio SOB (*Super Optimal Broth*) – pH 7,2**

Extrato de levedura 5,0 g/L

Triptona 20,0 g/L

NaCl 0,6 g/L

KCl 0,5 g/L

MgCl₂ 1 M* 10,0 mL/L

MgSO₄ 1 M* 10,0 mL/L

O pH foi corrigido com solução de NaOH 4M.

*Adicionados no momento do uso.

A triptona, o extrato de levedura, o cloreto de sódio e o cloreto de potássio foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave, 121° C por 20 minutos.

Foi preparada solução estoque de magnésio 2M, constituído de 1M de MgCl₂ e 1 M de MgSO₄. Essas soluções foram esterilizadas por filtração com membrana 0,22 µm. O magnésio foi adicionado na hora do uso.

3.3 Soluções e materiais para transformação de células

- **Solução de glicerol 50%**

Glicerol 50% (v/v)

- **Solução de glicerol 10%**

Glicerol 10% (v/v)

- **Solução de NaOH 4 M**

NaOH 160,0 g/L

- **Solução de KOH 4 M**

KOH 224,0 g/L

- **Solução de L-arginina 0,1 M**

L-arginina 17,4 g/L

- **Solução de MgCl₂ 1 M**

MgCl₂ 95,2 g/L

- **Solução de MgSO₄ 1 M**

MgSO₄ 120,4 g/L

- **Tampão acetato de sódio 1 M pH 7,5**

- **Acetato de sódio 81,85 g/L**

Ácido acético glacial 10 mL/L

- **MOPS 1M pH 6,8**

Ácido 3-(N-morfolino) - propanosulfônico 209,3 g/L

O pH foi corrigido com NaOH 4M.

* MOPS foi ajustado para pH 6,8 com NaOH e esterilizado por filtração com membrana tipo Milipore 0,22 µm.

- **Solução de IPTG 1 M**

Isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo 238,3 g/L

- **Antibióticos utilizados**

Os antibióticos foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm e adicionados ao meio de cultura no momento da utilização.

Antibiótico	Concentração de uso (µg/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>Z. mobilis</i>
Cloranfenicol	30	100
Ampicilina	100	-
Canamicina	50	350

3.4 Soluções para preparo de DNA plasmidial em pequena, média e grande escala (MINIPREP, MIDIPREP E MAXIPREP)

- **Solução I**

Tris-HCl 25 mM; pH 8,0

EDTA 10mM

Glicose 50 mM

- **Solução II**

NaOH 0,2 M

SDS 1% p/v

- **Solução III**

Acetato de potássio 5 M – 60 mL

ácido acético glacial 11,5 mL

H₂O – q.s.p 100 mL

- **TE**

Tris-HCl 10Mm; pH 8,0

EDTA 1mM)

3.5 Soluções para manipulações genéticas

- **Tampão de transformação I por RbCl**

RbCl 12,0 g/L

MnCl₂.4H₂O 9,9 g/L

Acetato de sódio 1 M pH 7,5 30,0 mL/L

CaCl₂.2H₂O 1,5 g/L

Glicerol 150,0 mL/L

O pH foi corrigido para 5,8 com ácido acético glacial.

- **Tampão de transformação II por RbCl**

RbCl 1,2 g/L

MOPS 1M pH 6,8 20 mL/L

CaCl₂.2H₂O 11,0 g/L

Glicerol 150,0 mL/L

- **Solução de Brometo de Etídeo 1% (p/v)**

Brometo de etídeo 10,0 g/L

- **Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0**

Ácido etilenodiamino tetra-acético 93,05 g/L

O pH foi corrigido para 8,0 com a adição de NaOH em pastilhas.

- **Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose**

TAE 50X pH 8,5

Tris-base 242,0 g/L

Ácido acético glacial 57,1 mL/L

EDTA 0,5 M (pH 8,0) 100,0 mL/L

- **Tampão de amostra 6X para eletroforese em gel de agarose**

TAE 50X 200,0 mL/L

Glicerol 50% 600,0 mL/L

Azul de Bromofenol 2,5 g/L Gel de agarose 1% (p/v)

- **Gel de agarose 1% (p/v)**

TAE 1X q.s.p. 1,0 L

Agarose 10,0 g/L

- **Marcadores de peso molecular para DNA**

Foram utilizados o marcador 2-log DNA ladder da New England Biolabs – NEB (EUA), o marcador 1 Kb da Sinapse (Brasil) e o marcador GeneRuler 1 kb plus da Sigma-Aldrich (Alemanha).

- **Enzimas de restrição**

Para confirmação das clonagens realizadas, foram realizadas as digestões das moléculas de DNA com as seguintes enzimas de restrição: BglIII (NEB), NdeI (Neb ou Thermo Scientific), XbaI (Roche), todas elas usadas conforme as especificações dos fabricantes.

- **Vetores**

Foi utilizado o vetor da série pBBR1MCS (KOVACH *et al.*, 1995), sendo utilizado o pBBR1MCS1, com a marca de resistência a cloranfenicol. A origem desse vetor é promíscua, sendo funcional em *E. coli* e em *Z. mobilis*. O mapa de restrição está ilustrado na Figura 8.

3.6 Materiais e soluções para análises de proteínas

- **Reagente de Bradford (BRADFORD, 1976)**

Comassie Brilhante Blue G 100,0 mg/L

Etanol 47,0 mL/L

Ácido orto-fosfórico 85,0 mL/

- **Solução SDS 10% (p/v)**

Dodecil sulfato de sódio 100,0 g/L

- **Acrilamida:bisacrilamida:** 29% acrilamida; 1% bisacrilamida.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8).

1 M Tris-HCl (pH 6,8).

10% SDS.

10% Persulfato de amônio.

- **Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8**

Trizma base 182,0 g/L

O pH foi ajustado com HCl fumegante 37% (p/p)

- **Tampão de amostra não desnaturante 5X**

Tris-HCl 60 mM (pH 6,8)

25% glicerol

0,1% azul de bromofenol

- **Solução APS 10% (p/v)**

Persulfato de amônio 100,0 g/L

- **Solução TCA 100% (p/v)**

Ácido tricloroacético 1,0 kg/L

- **Tampão de amostra 2x para eletroforese em gel de poliacrilamida**

Tris-HCl 1 M pH 6,8 200,0 mL/L

SDS 40,0 g/L

β -Mercaptoetanol 40,0 g/L

Glicerol 200,0 mL/L

Azul de bromofenol 1,0 g/L

- **Marcador de peso molecular para proteínas**

Foi utilizado o marcador de peso molecular de proteínas Unstained Protein Molecular Weight Marker da ThermoFisher (EUA), fervido por 5 minutos antes da utilização.

- **Tampão de corrida 10x para eletroforese em gel de poliacrilamida**

Trizma-base 30,0 g/L

Glicina 144,0 g/L

SDS 10,0 g/L

- **Solução de Comassie Blue Coloidal**

Comassie Brilhante Blue G 2,0 g/L

Metanol 200,0 mL/L

Ácido acético 70,0 mL/L

Sulfato de Amônio 100,0 g/L

A descoloração do gel é realizada com H₂O destilada

- **Tampão de amostra para a lise das células e extração de proteínas**

Tris-HCl 50 mM (pH 8,0)

Tween 20 1,25%

Mix de inibidores de protease 13,5 µL (solução estoque do mix de inibidores: 1 tablete de Complete Tablets Mini EDTA-free Easy pack dissolvida em 1 mL de água destilada)

3.7 Soluções e materiais para Gel de poliacrilamida para ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (EMSA)

- **Gel para EMSA**

Poliacrilamida (30%) e Bis-acrilamida (0,8%) 7,5 mL

Glicerol (50%) 7,5 mL

TEB 10X 1,125 mL

Água destilada 22,5 mL

Persulfato de amônio (25%) 200 µL

TEMED* 100 µL

* Adicionar por último na reação

TEB 10 X – 1000 mL

Trismabase	107,77 g
EDTA	29,77 g
Ácido bórico	55,02 g
pH*	8,4

* ajustar o pH com tris ou ácido bórico ao final do preparo

- **Tampão de ligação para EMSA 1X**

Tris HCl 10 mM - pH 7,5

EDTA 1 mM

KCl 50 mM

NaCl 50 mM

MgCl₂ 1 mM

DTT 5 mM

glicerol 5% - 5X

3.8 Soluções para *Western Blotting*

- **Tampão de transferência**

Tris HCl pH 8,3	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

- **PBS 1X (pH 7,4 – HCl)**

NaCl	136,9mM
Na ₂ HPO ₄	8,09 mM
NaH ₂ PO ₄	1,76 mM
KCl	2,69 mM

- **PBS 10X – T (Tween 20) – para 200 mL**

NaCl	16 g
Na ₂ HPO ₄	2,3 g
NaH ₂ PO ₄	0,486 g
KCl	0,4 g
Tween 20	0,1%

- **Solução de bloqueio**

5g de leite desnatado em pó/100 mL PBS -T

- **ABP - Solução para fosfatase alcalina**

Tris HCl pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5mM

- **Substrato cromogênico NBT/BCIP**

NBT: diluído em dimetilformamida 70%

BCIP: diluído em água

Foram diluídos 66 mL de NBT em 10 mL de ABP, homogeneizado e adicionado 33 mL de BCIP nesta solução (fazer um pouco antes da revelação).

Solução NBT/BCIP: 8 mL de água bidestilada/1 mL NBT/ 1 MI BCIP)

4.0 Métodos

4.1 Preparo de células de *E. coli* competentes para eletroporação

As bactérias *E. coli* DH5 α e JM 110 foram semeadas em placa de meio LB ágar 1,5% a partir de estoque armazenado a -80 °C e incubada a 37 °C por 16h. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB (*Super Optimal Broth*) em frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 37 °C por 16 h, com agitação de 200 rpm. Um mililitro desse pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio SOB, incubando a 37 °C até atingir uma densidade ótica (OD₆₀₀) de 0,3. Após atingir a OD₆₀₀ desejada, a cultura foi então resfriada por 15 min em banho de gelo e as células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min a 4°C. O sedimento de células foi ressuscitado em 32 mL de glicerol 10% (v/v) gelado e incubado no gelo por mais 15 min. Foi feita uma nova centrifugação, nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuscitadas para uma OD_{600nm} de 200 a 250 (aproximadamente 1 a 2 mL). As células foram ressuscitadas no volume residual presente no tubo de centrifuga. O conteúdo foi dividido em alíquotas de 100 μ L e armazenado a -80 °C (J. SAMBROOK, 1989).

4.2 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)

A extração de DNA plasmidial de *E. coli* foi feita de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Cols (2001), com adaptações. Uma colônia isolada da placa de transformantes foi inoculada em 5 mL de meio LB com o antibiótico adequado e este foi inoculado a 37 °C por 16 h sob agitação de 200 rpm. As células de 3 mL de cultura foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g por 2 min e o precipitado foi ressuscitado em 200 μ L de solução I. Foram adicionados 360 μ L de solução II e a amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 300 μ L de solução III gelada e a mistura foi incubada por 5 min em gelo. A amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, centrifugando novamente caso o sobrenadante não estivesse límpido. O sobrenadante foi adicionado a 750 μ L de isopropanol, homogeneizado por inversão e centrifugado a 10.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200 μ L de solução I. Foram adicionados 110 μ L de acetato de amônio 7,5 M e a amostra foi homogeneizada em agitador do tipo vórtice. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado pela adição de 750 μ L de etanol 100% gelado. Seguiu-se uma centrifugação a 10.000 x g por 5 min, o descarte do

sobrenadante e uma lavagem com 500 µL de etanol 70% gelado. Foi feita uma última centrifugação a 10.000 x g por 2 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado secado em um concentrador a vácuo. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água milliQ contendo RNase A (20 µg/mL) e incubado a 37 °C por 15 min. A solução contendo o DNA foi armazenado a -20 °C.

4.3 Preparação de DNA plasmidial em média e grande escala (midi e maxiprep)

Para a extração de plasmídeos bacterianos em larga escala, foi utilizado o kit *Qiagen Plasmid Midi and Maxi* (Qiagen) e as orientações do fabricante foram seguidas.

Também foi realizada a extração de DNA plasmidial de *E. coli* de acordo com o protocolo descrito por (J. SAMBROOK, 1989), com adaptações. Uma colônia isolada da placa de transformantes foi inoculada em 200 mL de meio LB com o antibiótico adequado e este foi inoculado a 37 °C por 16 h sob agitação. As células da cultura foram coletadas por centrifugação a 8.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 5 mL de solução I. Foram adicionados 10 mL de solução II, as amostras foram homogeneizadas lentamente invertendo várias vezes o tudo. Após, os tubos foram incubados em banho de gelo por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 7,5 mL de solução III gelada, repetindo-se o mesmo processo de homogeneização. Incubou-se novamente a amostra em banho de gelo por 20 minutos e seguido de centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4° C. O sobrenadante foi filtrado em gaze e transferido para outro tubo, onde adicionou-se 0,6 V de isopropanol e, após incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o sedimento foi deixado exposto ao ar para secagem. O sedimento foi ressuscitado em 0,5 mL de TE e transferido para um tubo novo. Adicionou-se RNase A para uma concentração final de 2 µg/mL e a amostra foi incubada a 37° C por pelo menos 20 minutos. Foi adicionado fenol/clorofórmio e extraídas as proteínas por agitação intensa em vórtice por 1 minuto. A fase aquosa foi transferida com auxílio de micropipeta para outro tubo, desprezando a fase fenólica e a interfase. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 30 minutos a 4° C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C. Foi deixado o tubo aberto a temperatura ambiente para a secagem do sedimento. Foi feita a ressuspensão do DNA plasmidial em 100 µL de água miliQ RNase A (20 µg/mL) e incubado a 37 °C por 15 min. A solução contendo o DNA plasmidial foi armazenado a -20 °C.

4.4 Análise de ácidos nucleicos por eletroforese

A análise de DNA por eletroforese foi feita de acordo com Sambrook, *et al.*, (2001), com adaptações. O gel foi confeccionado utilizando tampão TAE 50X (Tris-acetato-EDTA), com uma concentração de 1% de agarose e 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Foi adicionado o tampão de amostra que foi preparado (6X): glicerol (30% v/v) e azul de bromofenol ou xileno cianol (0,25% m/v). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma diferença de potencial (60 v, 130 A) para a migração e separação dos fragmentos de DNA. O brometo de etídio foi utilizado como corante, assim, a visualização foi feita com a exposição do gel à luz ultravioleta.

4.5 Purificação e eluição de fragmentos de DNA

A purificação de DNA proveniente de reações de PCR, assim como de bandas provenientes de géis de agarose, foi feita com o kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

4.6 Quantificação de DNA

Foi utilizado espectrofotômetro modelo NanoDrop One (ThermoFisher Scientific) para realização da quantificação de DNA, seguindo as instruções do fabricante. E quando necessário, uma quantificação adicional foi realizada pela análise em gel de agarose com o programa ImageLab (BioRad).

4.7 Transformação e preparação de células competentes de *E. coli* por choque térmico com RbCl

Uma linhagem de *E. coli* foi crescida em 50 mL de meio SOB a 37° C a 200 rpm até atingir a OD_{600nm} de 0,3. Logo após a cultura com as células foi centrifugada a 3.000 x g por 5 min a 4° C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 16 mL de tampão de transformação I, incubadas por 15 min a 4° C e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Após, as células foram ressuspensas em 4 mL de tampão de transformação II e incubadas por 30 min a 4° C. Por fim, uma alíquota de 100 µL das células competentes foram incubadas com 100 ng de DNA e incubadas no gelo por mais 40min. Esse sistema foi submetido a choque térmico a 42° C por 90 segundos e em seguida incubados com 1 mL de meio LB por uma hora a 37° C a 200 rpm. Após a recuperação, as células foram

semeadas em placas com meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado e incubadas por 16 horas a 37° C (SAMBROOK; GREEN, 2012).

4.8 Transformação de *Z. mobilis* ZM4 por eletroporação

Uma colônia isolada de *Z. mobilis* ZM4 foi cultivada a 30° C a 100 rpm em 5 mL de meio RM com 20 g/L de glicose por 24 horas. Foi retirado volume de 2 mL do pré-inóculo para realização do inóculo em 100 mL de meio RM nas mesmas condições anteriores. Essa cultura foi acompanhada até o OD_{600nm} de 0,60, quando as células foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 min a 4° C. Depois, as células foram ressuspensas em 10 mL de solução de glicerol 10% (v/v), centrifugadas novamente nas mesmas condições e ressuspensas em 500 µL glicerol gelado e aliqüotadas. A uma aliqüota de 100 µL foi adicionado o DNA (~ 1 µg) e incubado em gelo por 30 min.

Esse sistema foi transferido para cubetas de 0,2 cm (BioRad) e submetidos a corrente elétrica em eletroporador da BioRad nas seguintes condições: 200 Ω, 25 µFe 2,5 Kv. Após o choque foi adicionado 900 µL de meio de recuperação e incubado a 30° C sob agitação de 300 rpm por no mínimo 2 horas. Quanto maior o tempo de recuperação das células melhor a eficiência da transformação. As células foram plaqueadas em meio RM ágar adicionado de 100 µg/µL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa a 30° C por 48/96 h. O protocolo de eletroporação para *Z. mobilis* ZM4 foi desenvolvido a partir de adaptações de protocolos propostos (JEON *et al.*, 2002; ZOU *et al.*, 2012; ROGERS *et al.*, 2007)

4.9 Construção de plasmídeos e manipulação de DNA

Para as construções dos plasmídeos foram utilizadas técnicas básicas de biologia molecular, conforme descrito por Sambrook *et al.*, (2001).

Para a obtenção dos fragmentos de DNA foram utilizadas diferentes enzimas de restrição, obedecendo as instruções do fabricante New England Biolabs.

No processo de construção de vetores por ligação, produtos de PCR ou fragmentos de DNA provenientes de digestão foram unidos ao vetor numa proporção de 3:1 quando provenientes de digestão e 10:1 quando provenientes de PCR. Para a ligação utilizou-se T4 DNA ligase (USB) de acordo com as instruções do fabricante.

4.10 Precipitação de DNA:

Para limpeza do DNA foi realizada a precipitação adicionando acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. A solução foi incubada a -20 °C por 16 h, e então as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado novamente a 10.000 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em um concentrador a vácuo e ressuspendido em água milliQ.

4.11 Amplificação pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Paras as ampliações dos fragmentos por PCR foram utilizadas diferentes enzimas, conforme a aplicação. Foram utilizadas as enzimas Phusion High Fidelity DNA (ThermoFisher), enzima de alta fidelidade, Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e *MyTaq Polymerase* (Bioline). Todas as enzimas foram utilizadas conforme as instruções dos fabricantes. As PCRs foram realizadas em um termociclador modelo BS-LifeEco (Bisen, China). Para PCR de colônia, uma pequena porção de células foi adicionada ao tubo de reação com auxílio de um palito estéril em 10 µL de água, a etapa de desnaturação inicial teve um acréscimo de 5 minutos. Todas usadas de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.12 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram todos sintetizados e com purificados por HPLC, estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos do promotor

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	TM °C
pB1Ppdc ₅₀₅ -R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATCATATGCTTACTCCATATAT	65,3 °C
pB1Ppdc ₄₀₅ -F	GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGGCCGTTTCATGACAACAGC	73,3 °C
pB1Ppdc ₃₀₅ -F	GCGGTGGCGGCCGCTCTAGACCTTTTTCAAGGTGTCCCGT	72,9 °C
pB1Ppdc ₁₉₇ -F	GCGGTGGCGGCCGCTCTAGATCGCTCATGTGCGGACATG	72,7 °C
pB1Ppdc ₁₄₆ -F	GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGA	72,7 °C
pB1eGFP-F	ATATATGGAGTAAGCATATGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	65,3 °C
pB1eGFP-R	GCTCTAAGTTTATTTAAAAAAGATCTTTACTTGTACAGCT	57,7 °C
Sigma 70 - F	GGATCCATGGCAGAGACGACTACGGCTG	65,2 °C
Sigma 70 - R	GCGGCCGCCTAGTGGTCGAGGAAGCT	69,7 °C
Sigma 24 - F	GGATCCATGATCGAAAATCATGAAAAAGAGACAAATTCTCC	61,4 °C
Sigma 24 - R	GCGGCCGCCTAGCGACCGTTACTAAGGTCGC	69,1 °C
C1	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG TCATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAG CAATGAGTTAT	Anelamento
C2	GCCTAGGGGGGGGTCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGG GTCATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAA GCAATGAGTTAT	Anelamento
C3	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG TCATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAG CAATGAGTTAT	Anelamento
C4	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTGGGGGGGGTTC TGGGTCATCC	Anelamento
Senso 1M	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG TCATCG	Anelamento
Senso 1SM	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG TCATCG	Anelamento
Senso 2M	GGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTG	Anelamento
Senso2 SM	GGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTG	Anelamento
N1 -F	CGGTGGCGGCCGCTCTAGACCTTTTTAAGGTGTCCCGTTCCT TTTTCCCTTTTTGGAGGTTGGTTATGTCTATAATCACTTAAT CCAGAAACGGGCGTTTAG	Anelamento

N1 -R	GCCGAAGCGAAAAGACTAAACAACCATGATGGACAAAGCTA AACGCCCGTTTCTGGATTAAGTGATTATAGGACATAACCAAC CTCCAAAAGGGGAAAAAGGAACGGGACACCTTGAAAAAG GTCTAGAGCGGCCGCCACCG	Anelamento
N2 - F	CGGTGGCGGCCGCTCTAGACCTTTTTAAGGTGTCCCGTTCCT TTTTCCATCATGGTTGTTTAGTCTTTTCGCTT	Anelamento
N2 -R	GCCGAAGCGAAAAGACTAAACAACCATGATGGAAAAAGGA ACGGGACACCTTGAAAAAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCG	Anelamento
N3 - F	CGGTGGCGGCCGCTCTAGCCCTTTTGGAGGTTGGTTATGTCC TATAATCACAGTCTTTTCGCTTCGGC	Anelamento
N3 -R	GCCGAAGCGAAAGACTGTGATTATAGGACATAACCAACCTC CAAAAGGGCTAGAGCTAGAGCGGCCGCCACCG	Anelamento

*pd*c. Δ -35 = região -35 do promotor *pd*c mutada, Δ -10 = região -10 do promotor *pd*c mutada, M = sonda marcada com FAM , SM = sonda sem marcação de FAM

4.13 Sequenciamento de plasmídeos

Para conferência da sequência dos plasmídeos construídos foi enviado material para a empresa Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte-MG), a empresa utiliza o método de Sanger para amplificação das sequências e a plataforma ABI 3130 (Thermo Scientific) para eletroforese. Resultados em Anexo 1.

4.14 Análises de bioinformática

O alinhamento simples de sequências utilizou a ferramenta Online Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool - BLASTn (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Já as sequências obtidas por sequenciamento dos vetores foram comparadas com as sequências esperadas utilizando a ferramenta online asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/

4.15 Culturas de *Z. mobilis* recombinante cultivada em meio sólido

As culturas de *E.coli* DH5 α e JM110 foram retiradas do estoque armazenado em freezer -80° C e plaqueadas em meio LB ágar. As placas foram cultivadas durante 24h em estufa 37° C. Estas células foram utilizadas para inserir plasmídeos de interesse nas células de ZM4.

As culturas de ZM4 utilizadas, foram retiradas do estoque armazenado em freezer -80°C e plaqueadas em meio RM sólido, cultivadas durante 48h em estufa 30° . Estas foram utilizadas na construção de células transformantes de ZM4.

4.16 Teste de fluorescência em placa (teste piloto)

Foram selecionados um clone de cada construção e repassados para um tubo contendo 50 mL de meio RM suplementado com 100 µg/mL de cloranfenicol e incubados por 28 h a 30° C, sob agitação de 100 rpm. Foi medida a OD_{600nm} e todos os clones iniciaram o crescimento em uma OD_{600nm} inicial de 0,1.

Para aplicar a cultura na placa teve-se o cuidado de aplicar a mesma sobre o meio sólido de forma que formasse uma gota. Foi deixada a placa aberta no fluxo laminar até que o líquido fosse absorvido pelo meio sólido. Após aproximadamente 30 h de incubação as placas foram observadas no equipamento Amersham ImageQuant 600 – GE, com comprimento de onda 518 nm e avaliadas quanto a intensidade de fluorescência.

4.17 Citometria de fluxo

Para a realização da citometria de fluxo, foram preparados inóculos com as linhagens transformadas de *Z. mobilis*. Células de uma colônia isolada foram repassadas para um tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio RM com 100 µg/µL de cloranfenicol, incubado durante aproximadamente 28 h a 30°C, sob agitação de 200 rpm.

Após a incubação foi retirado 1 mL de cada tubo (triplicata de cada clone), colocado em eppendorf estéril e centrifugados por 2 min. a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em PBS 1X. Foram feitas diluições seriadas até 10⁻⁵.

Os clones foram analisados por citometria de fluxo, identificando os plasmídeos conforme o tamanho do fragmento do promotor *pdc*, *Ppdc505*, *Ppdc405*, *Ppdc305*, *Ppdc197* e *Ppdc146*. Ainda, foram construídos os controles negativos que foram identificados como D (só contendo eGFP), PV (plasmídeo vazio) e V2 (só contendo *Ppdc505*). Cada construção com os diferentes fragmentos do promotor do gene *pdc*, foram preparados e analisados em citômetro de fluxo BD LSR Fortessa equipado com lasers de 405 nm, 488 nm e 640 nm. Para análise dos dados, foi usado o *software FlowJo*.

4.18 Preparo extrato bruto de *Z. mobilis*

A cultura de *Z. mobilis* foi cultivada em placa com meio RM sólido suplementado com 100 µg/mL de cloranfenicol, as placas foram incubadas a 30° C durante 48 h.

Foram selecionadas algumas colônias para o preparo do pré-inóculo. Em cada tubo contendo 5 mL de meio RM líquido suplementado com 100 µg/mL de cloranfenicol foi adicionada uma colônia, os tubos foram incubados em agitador a 100 rpm a 30° C durante 48 h.

O inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 mL. Foi adicionado em cada Erlenmeyer 100 mL de meio RM líquido suplementado com 100 µg/mL de cloranfenicol. Em cada frasco adicionou-se 1 mL do pré-inóculo e os mesmos foram incubados em agitador orbital a 100 rpm a 30° C, durante 24 h.

No dia seguinte todo o volume de cultura foi centrifugado a 5.000 x g a 4° C, durante 10 minutos. Cada frasco contendo o precipitado foi armazenado a -20° C para posterior processo de lise das células.

Os precipitados foram ressuspensos em 10 ml de tampão de ligação para EMSA 1X. Foi adicionado inibidor de protease 40 µL/mL e lisozima 200 mg/mL antes do processo de lise, os tubos foram incubados a 30° C por 30 min. Após, as amostras foram levadas ao sonicador (Qsonica Sonicators) e lisadas nas condições: amplitude 50, tempo de processo 1 min e 40 s, tempo de pulso 10 s. O lisado foi centrifugado a 13.000 rpm/10 min/4° C. O sobrenadante foi quantificado pelo método de BRADFORD, (1976).

4.19 Protocolo de ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (EMSA)

- **Preparo dos Oligonucleotídeos**

Todos os oligonucleotídeos foram ressuspensos em água MilliQ para uma concentração 1 µg/µL, essas foram determinadas de estoque mãe e foram armazenados em freezer a -20° C.

Foram utilizados dois tipos diferentes de sondas, uma sonda marcada com FAN W18 contendo o motivo HRE de *enhancer 5'* da eritropoetina humana marcado com fluorescência na extremidade 5', do qual foi preparado um estoque de uso com concentração de 20 µg/µL. E uma sonda não marcada (fria), da qual foi preparado estoque de uso a uma concentração de 500 µg/µL.

- **Anelamento dos oligonucleotídeos marcados com fluoresceína na extremidade 5'**

Foram inseridos 25 µL do oligo *forward* (marcado) juntamente com 25 µL do oligo *reverse* (não marcado) em microtubo com volume final de 50 µL. As amostras

foram aquecidas a 94°C em banho maria durante 5 minutos e posteriormente deixados esfriar durante a noite juntamente com a água do banho maria, para favorecer o anelamento dos oligonucleotídeos. No dia seguinte, os tubos foram armazenados em freezer a temperatura de -20° C.

- **Sistema de ligação DNA/proteína - Sondas**

Sistema de ligação DNA/proteínas para cada extrato proteico:

Componentes	Volume adicionado (µL)	Quantidade adicionada (ng)
Sonda marcada com FAM	0,75 µL	20 ng
Extrato proteico*	Conforme a concentração do extrato	10 µg/µL
DNA carreador – DNA de salmão	1 µL	200ng
Tampão de ligação 5X	4 µL	-
Sonda fria		500 ng
H ₂ O MilliQ	q.s.p. 20 µL	

*A quantificação dos extratos proteicos é feita utilizando o ensaio de Bradford (1976).

Os sistemas de ligação de cada uma das amostras dos extratos proteicos foram preparados em tubos com capacidade para 1 mL. A quantidade de extrato proteico utilizado foi de 10 ng. As reações para cada sistema foram incubadas por 2 horas no gelo. Em seguida, foi adicionado 5µL de tampão de amostra para EMSA, levando a um volume final de 30µL para cada umas das reações.

4.20 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel recém preparado foi adicionado no sistema de eletroforese, cujas placas de vidro foram exaustivamente lavadas com detergente e água destilada e secos com papel toalha. Aguardou-se o gel polimerizar, a câmara eletroforética foi montada e preenchida com Tampão TEB 0,5X. Foi realizada uma pré-corrída por 30 minutos a 180V (~26mA) e após foi aplicado 20 µL de cada uma das reações. Para a corrida eletroforética, foi

aplicado 180V, até que o azul de bromofenol, presente no tampão de amostra para EMSA, migrasse por cerca de 10 cm, isto é, em aproximadamente 2 horas de corrida.

- **Análise do gel**

Foram observadas a presença ou ausência de bandas no gel em fotodocumentador *Amersham* GE, com comprimento de onda 518 nm e avaliadas quanto à intensidade de fluorescência.

4.21 Construção de linhagens por método de anelamento de oligonucleotídeos

Para construção das diferentes linhagens de *Z. mobilis* foi realizado protocolo de anelamento dos primers conforme descrito para o anelamento dos oligonucleotídeos utilizados no experimento de EMSA. Foi adicionado 15 µL do oligonucleotídeo *forward* e 15 µL *reverse* em um microtubo, juntamente com tampão de anelamento e DTT. Logo após, realizou-se à fervura dos microtubos e resfriamento lento *durante* a noite. Após o resfriamento, os primers anelados foram ligados ao plasmídeo utilizando reação de ligação.

- **Reação de ligação**

Vetor (100 ng/µL)	0,5 µL
Inserto (20 ng/µL)	1,0 µL
Tampão	2 µL
Enzima*	0,2 µL
Água MilliQ	16,3 µL
Volume final	20 µL

* Enzima T4 DNA ligase Promega 10/20 u/µL

Foi realizada transformação por choque térmico em *E.coli* e por eletroporação em ZM4. As linhagens construídas foram cultivadas e posteriormente analisadas por citometria de fluxo quanto a luminescência de eGFP.

4.22 Ensaio de *Supershift*

Um anticorpo monoclonal anti-RNA polimerase sigma 70 (Invitrogen/Life Thermo) foi utilizado para realização desse método. O anticorpo foi preparado e diluído para uma proporção de 1:1000 em solução de PBS estéril. Todas as soluções utilizadas, bem como o método aplicado foram idênticos ao método de EMSA. Algumas etapas foram acrescentadas nesse método como, incubação das reações durante 1 hora sem

adição do anticorpo a temperatura ambiente e seguido de mais 1 hora com a adição do anticorpo nas reações. Foi realizada pré-corrída do gel para EMSA utilizando um sistema SDS-Page (Biorad) durante 30 min com o tampão de corrida, para equilibrar o gel a 80 volts. Após 10 minutos do início da pré-corrída foi aumentado o parâmetro para 100 v. Após esta etapa, iniciou-se imediatamente o processo de corrida das amostras no gel, o período total em que as amostras permaneceram correndo no gel foi de aproximadamente 10 horas a 100 v.

Para a transferência, a membrana e o papel filtro (ambos da Biorad) foram cortados do mesmo tamanho do gel e embebidos na solução de transferência. Para a montagem do sistema foi obedecida a seguinte ordem: papel filtro - membrana – gel - papel filtro. Foi utilizado um sistema SDS- Page, com amperagem de 0,16 A e voltagem de 15 V, durante 15 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (Sigma), e lavada com água destilada. A membrana permaneceu durante a noite em banho com água destilada sob leve agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada com PBS 1X, e incubada com a solução de bloqueio durante 1 h e 30 minutos, foi lavada com PBS-T e incubada com o anticorpo monoclonal anti-RNA polimerase Sigma 70 por 1 h.

Após a incubação, a membrana foi lavada novamente com PBS-T por 3 vezes durante 2 minutos, seguido de uma lavagem 1 vez com APB e foi adicionado o substrato cromogênico. O aparecimento de bandas na membrana foi controlado visualmente. A reação foi parada com água destilada. Foi utilizado marcador pré-corado PageRuller Plus Prestained Protein (Fermentas)

5. Resultados e discussão

Para um melhor entendimento deste estudo os resultados serão apresentados em capítulos:

- capítulo I - descrição da construção de plasmídeos contendo diferentes fragmentos do promotor *pdv* de *Z. mobilis*.
- capítulo II - construção de plasmídeos para definir as regiões -10 e -35 do *pdv* de *Z. mobilis*.
- capítulo III – descrição das análises realizadas por EMSA, *Supershift* e *Western Blotting*.

5.1 Capítulo I - Construção de vetores para análise da atividade do promotor *pdc*

Etapa I

A estratégia desenhada para construção dos vetores contendo diferentes fragmentos do promotor *pdc* controlando a expressão do gene *eGFP* pode ser visualizada Na Figura 3.

Estratégia etapa I

Para a realização de clonagem do gene a ser expresso em *Z. mobilis* foi utilizado o vetor da série pBBR1MCS (KOVACH *et al.*, 1995), que possui marca de resistência a cloranfenicol e origem de replicação promíscua, sendo funcional tanto em *E. coli* quanto em *Z. mobilis*, além de ser parcialmente estável em *Z. mobilis* (DONG *et al.*, 2011; S. ZOU *et al.*, 2011; S. L. ZOU *et al.*, 2012). Na Figura 3 está apresentada a estratégia desenhada para esta etapa.

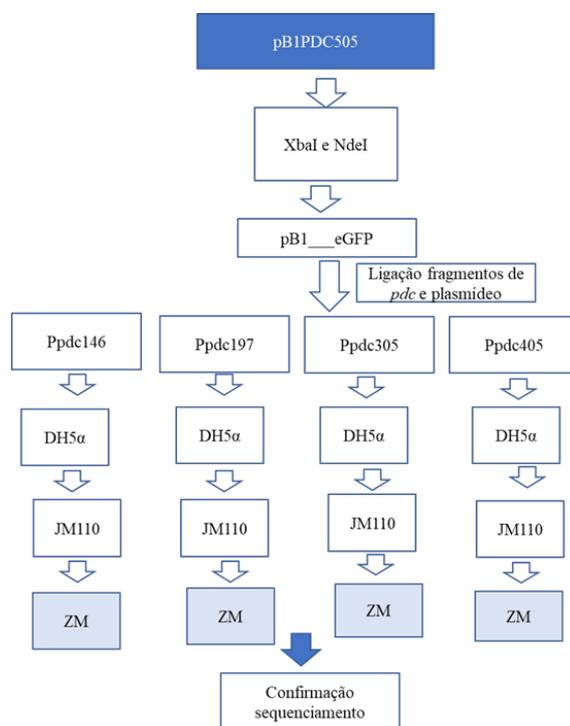


Figura 3. Construção de plasmídeos utilizando o vetor pB1PDC505 flanqueado pelas enzimas de restrição XbaI e NdeI. Os plasmídeos foram construídos utilizando os fragmentos do promotor *pdc* de *Z. mobilis* com 146, 197, 305 e 405 pb. Após a realização das construções, as linhagens de *E. coli* DH5α e JM110 foram

transformadas por eletroporação e em seguida a bactéria *Z. mobilis* foi transformada pelo mesmo processo. O DNA total de 3 clones de cada construção foi extraído, e enviado para sequenciamento para confirmação das construções.

Para confirmação 3 clones de *Z. mobilis* de cada construção, foram enviados para sequenciamento.

Para as construções foi utilizado o vetor pB1PDC (Figura 4). Ao vetor pB1PDC foi adicionado o promotor *pdc* com 505 pb (*Ppd_{c505}*) e seu terminador (*Tpd_c*). Como gene repórter foi utilizada a sequência codificadora da proteína eGFP. Na Figura 5 está representado o mapa de restrição do cassete de expressão. Os outros vetores foram construídos pela substituição do *Ppd_c* de 505 pb com diferentes tamanhos de fragmentos do promotor *pdc* originando os plasmídeos, *Ppd_{c146}*, *Ppd_{c197}*, *Ppd_{c305}* e *Ppd_{c405}*, contendo os fragmentos de 146, 197, 305 e 405 pb, de *pdc* respectivamente.

Análise eletroforética em gel de agarose foi realizada para observação dos fragmentos esperados do promotor *pdc*, conforme Figura 6.

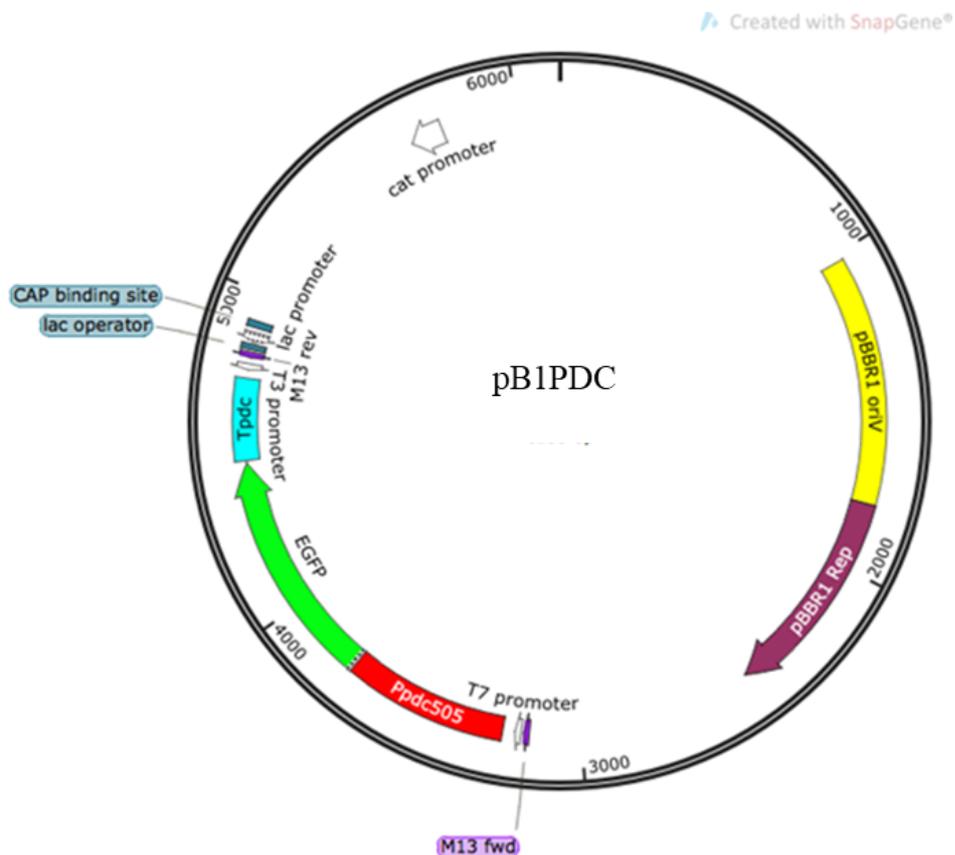


Figura 4. Mapa do vetor pB1PDC. Sua estrutura contém o promotor *pdc* 505 pb controlando a expressão da proteína eGFP, terminador *Tpdc*, origem de replicação pBBR1, promotor *cat*, promotor *lac*, M13 *forward* e M13 *reverse*.

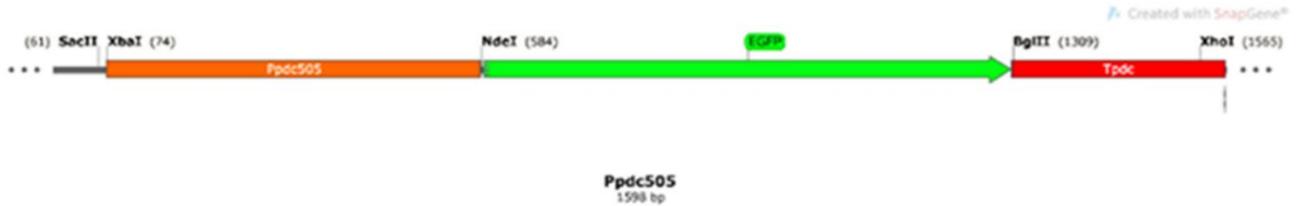


Figura 5. Mapa de restrição do cassete de expressão. Contendo *pdc* 505, o gene *eGFP* (gene repórter) e o terminador do promotor *pdc*, além dos sítios de enzima de restrição utilizados para fazer esta e as demais construções.

Para obtenção dos diferentes fragmentos do promotor *pdc* foi utilizada a técnica de PCR com os primers *Ppdc*₅₀₅-R, *Ppdc*₄₀₅-F, *Ppdc*₃₀₅-F, *Ppdc*₁₉₇-F e *Ppdc*₁₄₆-F, conforme citado na Tabela 5 (materiais e métodos). A seguir os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *Nde*I e *Xba*I e ligados ao vetor pB1PDC digerido. Em seguida, *E. coli* DH5 alfa foi transformada com os diferentes vetores. Após a transformação o DNA plasmidial obtido foi utilizado para transformar *E. coli* JM110 para desmetilação e posterior transformação de *Z. mobilis*. O DNA total de 3 clones de cada construção foram extraídos, amplificados em *E. coli* e enviados para sequenciamento para confirmação das construções (Anexo 1).

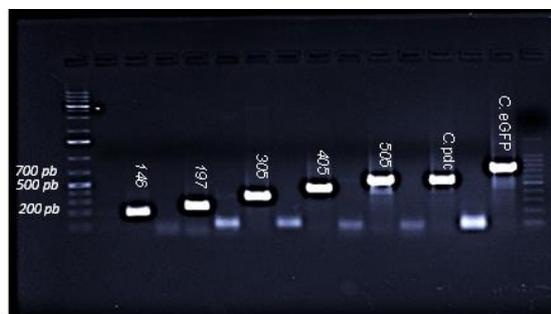


Figura 6. Fragmentos de *pdc* esperados 146, 197, 305, 405, 505 pb e controle *pdc* (contendo 505 pb) e controle eGFP (contendo 720 pb). PCR de colônia realizado com os clones resultantes de *Z. mobilis*. Análise eletroforética. Gel de agarose 1%, marcador molecular 1 kb Ladder (Sinapse)

Na Figura 7 abaixo observa-se de forma esquemática a estrutura das construções que foram utilizadas na realização análise de citometria de fluxo. Foram construídos dois controles negativos, D (sem gene *eGFP*), V2 (sem *pdc*) e as construções com os fragmentos de *pdc* a serem analisadas, contendo promotor *pdc* com 505, 405, 305, 197 e 146.

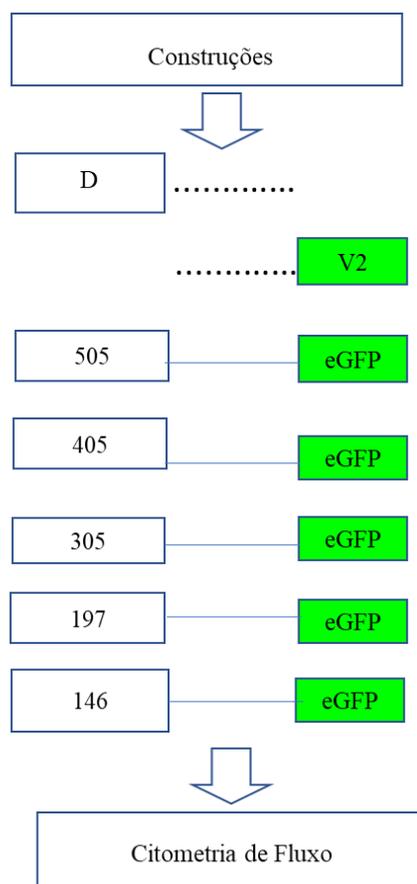


Figura 7. Modelo esquemático das construções desenvolvidas nesta etapa para a realização de citometria de fluxo. Foi utilizado plasmídeo pB1PDC, realizada digestão com as enzimas XbaI e NdeI, inserido o fragmento *pdc* (505, 405, 305, 197 e 146 pb) e ligado ao plasmídeo por Inflation. Após a obtenção dos clones, os mesmos foram analisados em triplicata por citometria de fluxo.

5.2 Avaliação da expressão de *eGFP* nas culturas de *Z. mobilis* recombinantes

Antes de realizar a Citometria de fluxo, foi realizado um teste piloto para verificar atividade de *eGFP* em *Z. mobilis*. Para isto, os clones recombinantes de ZM foram cultivados em meio sólido. Após o crescimento das culturas, as mesmas foram observadas no equipamento *Amersham GE Imager 600*, com comprimento de onda de 518_{nm}, para a

observação de fluorescência, Na Figura 8 pode-se observar as diferentes intensidades de fluorescência das culturas, que foram semeadas em forma de gota. Após a incubação por aproximadamente 30 horas foram observados que os clones contendo plasmídeo com os maiores fragmentos do promotor *pdc*, *Ppdc*₅₀₅, *Ppdc*₄₀₅, *Ppdc*₃₀₅, apresentaram maior intensidade de fluorescência, enquanto que as linhagens as construções com os fragmentos menores do promotor *pdc*, *Ppdc*₁₉₇ e *Ppdc*₁₄₆, apresentaram menor intensidade. Com esperado os controles negativos não apresentaram fluorescência.



Figura 8. Placa com cultura de *Z. mobilis* modificada semeada em forma de gota, contendo plasmídeo pB1PDC com diferentes fragmentos do promotor *pdc* (146, 197, 305, 405 e 505 pb), controle negativo D, PV e V2. A placa com as culturas foi observada em equipamento *Amersham Imager 600*.

- 1 - D - controle negativo contendo o gene eGFP, sem o promotor *pdc*,
- 2 - PV - controle negativo com plasmídeo vazio,
- 3 - V2 – controle negativo contendo o promotor *Ppdc*₅₀₅,
- 4 - *Ppdc*₅₀₅, *pdc* com 505 pb
- 5 – *Ppdc*₄₀₅, *pdc* com 405 pb
- 6 – *Ppdc*₃₀₅, *pdc* com 305 pb
- 7 – *Ppdc*₁₉₇, *pdc* com 197 pb
- 8 – *Ppdc*₁₄₆, *pdc* com 146 pb

5.3 Análise da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo

Para testar a força do promotor pela expressão de fluorescência de *eGFP*, foram selecionados 3 clones de cada construção contendo os diferentes tamanhos de fragmentos do promotor do gene *pdv*

O gráfico abaixo (Figura 9), apresenta os resultados das análises de fluorescência de *eGFP* emitida por cada clone de *Z. mobilis* modificado, com diferentes tamanhos de fragmentos do promotor *pdv*. Como esperado os controles negativos não emitiram sinal de fluorescência. Foi observado diferentes níveis de fluorescência das construções, demonstrando que há diferenças de intensidade conforme o tamanho do fragmento do promotor *pdv*. O número de células detectadas pelo equipamento foram de aproximadamente 300.000 a 400.000 células, sendo que em 90% das células analisadas havia presença de *eGFP*. Na Figura 10 estão apresentados os resultados da citometria de fluxo analisados pelo Software FlowJo, estes resultados também foram analisados pelo teste estatístico ANOVA.

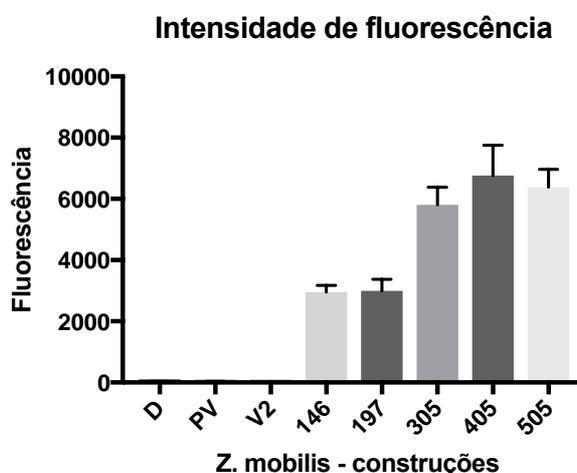


Figura 9. Gráfico da análise da expressão de fluorescência por citometria de fluxo.

As culturas de cada construção foram preparadas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSR Fortessa equipado com lasers de 405_{nm}, 488_{nm} e 640_{nm}. Para análise dos dados, foi usado o *software* FlowJo.

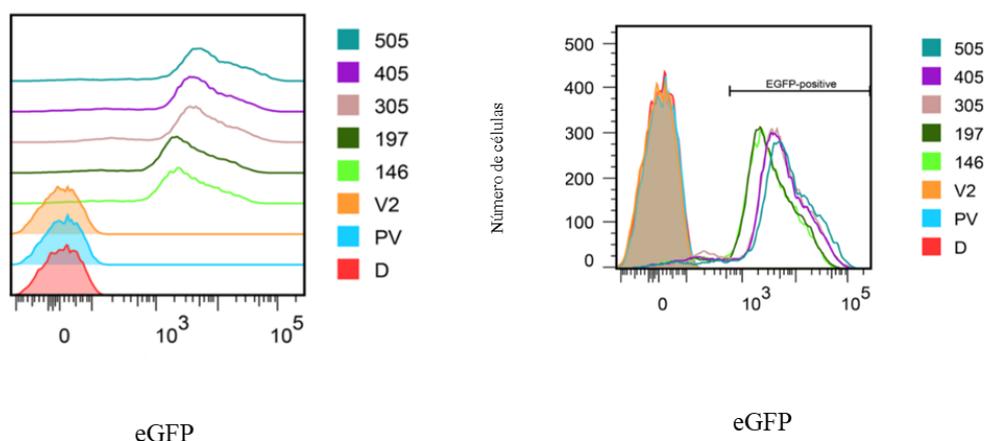


Figura 10. Gráficos com os resultados de citometria de fluxo analisados pelo *Software FlowJo*. Os dados fornecidos pela citometria de fluxo foram analisados pelo teste estatístico ANOVA.

A análise demonstrou que não há diferença significativa entre os clones 146 e 197 e entre os clones 305, 405 e 505. Contudo, há diferença significativa entre os clones 197 e 305 ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos pela citometria de fluxo sugerem que entre as regiões -197 e -305 existe uma região reguladora positiva do promotor do gene *pdv* e um provável sítio de ligação dos fatores ativadores de transcrição.

Quando o promotor *gap* foi analisado por Hudispeth, (2010) (US 7.989.206B2), foi observada uma região regulatória em -190 e -89, muito similar a localização da região regulatória observada em *pdv* (neste estudo). Assim, essa possível região regulatória, apresenta similaridade com a região do promotor P1 do promotor *gap* de *Z. mobilis*.

Conway *et al.*, (1987b) propuseram *in silico* as prováveis regiões consenso entre os promotores dos genes codificadores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gap*), piruvato descarboxilase (*pdv*) e álcool desidrogenase B (*adhB*). As regiões -10 e -35 foram propostas baseadas na afirmação preconcebida de que havia semelhança entre os promotores de *Z. mobilis* e *E. coli*. No entanto, Neale, *et al.* (1987) clonaram o gene *pdv* da linhagem ZM6 de *Z. mobilis* e realizaram experimentos similares aos de Conway, *et al.*, (1987b). No entanto, ao analisar 200 pb da região promotora do gene *pdv* de ZM6

in silico, os autores identificaram as possíveis regiões -10 e -35, e confirmaram que não havia homologia com as regiões -10 e -35 de *E. coli*.

Barnell *et al.*, (1992), afirmaram que existe uma homologia significativa para todos os promotores altamente expressos em *Z. mobilis* (*adhBp1*, *pdc*, *gap*, *adhBp2*, *eno*, *eda* e *pgi*), portanto estes promotores seriam muito parecidos. A bactéria *Z. mobilis* possui posição taxonômica próxima a *Pseudomonas aeruginosa*, porém, quando os promotores foram comparados não foi encontrada similaridade significativa, foi obtida o mesmo resultado quando os promotores de *Z. mobilis* foram comparados com os promotores de *E. coli* (BARNELL *et al.* 1992).

No presente estudo foi constatado que o tamanho mínimo do fragmento de *pdc* que pode ser utilizado na construção de plasmídeos é de 305 pb, o que difere da atual literatura, pois até hoje a maioria dos estudos utiliza 500 pb do promotor *pdc* de *Z. mobilis*. A utilização de um promotor *pdc* com tamanho reduzido pode auxiliar na estabilidade nos processos de transformação de *Z. mobilis* (CONWAY; SEWELL; INGRAM, 1987, DUNN e RAO, 2015, ZHANG *et al.*, 2016). Com isso, a utilização de um fragmento menor do promotor *pdc*, com 305 pb, não afeta a expressão do gene dirigido pelo promotor. Provavelmente a região mais importante do processo de transcrição esteja dentro dessa sequência de 305 pb de *pdc*. Isso pode facilitar o estudo do promotor, pois ao contrário de todos os estudos realizados até hoje, esse estudo aponta experimentalmente a possível localização da sequência de início da transcrição, o que pode auxiliar os estudos futuros do promotor *pdc* de *Z. mobilis*.

6.0 Capítulo II – Construções para definir as regiões -10 e -35 do *Ppdc* de *Z. mobilis*

- **Estratégia I**

Estudos realizados com a bactéria *E. coli*, afirmam que as informações essenciais para a função dos promotores desse micro-organismo estão na posição -35, sugerindo que as regiões que flanqueiam a região -35 também possam importantes para a função do promotor. A função do promotor não é independente dos contatos entre a enzima e as sequências fora da região de 35 pb, a subunidade sigma da enzima só é liberada após uma sequência de 8-11 nucleotídeos serem transcritos. Isso sugere que é de fato o reconhecimento pela enzima que causa a diferença na força entre os promotores (KAMMERER *et al.* 1986). A partir do fragmento do promotor 146 pb foram desenhados novos oligonucleotídeos para analisar a importância das regiões -10 e -35 propostas por Conway *et al.*, (1987). O plasmídeo pB1PDC foi previamente digerido com a enzima XbaI, os oligonucleotídeos foram anelados e ligados ao plasmídeo pB1PDC.

Estudos realizados por Vera *et al.*, (2020) revelaram que os elementos promotores de *Z. mobilis*, -10 e -35 possuem semelhança com os elementos canônicos -10 e -35 de *E. coli*. No entanto, apresentam uma exceção: o elemento -10 de *Z. mobilis* não possui uma timina altamente conservada da região -7, assim como os promotores da alfa-proteobactéria *Caulobacter crescentus*. Esse resultado sugere que a região -10 do promotor *pdC* de *Z. mobilis* não seja muito importante no processo de transcrição, no entanto, a região -35 seria indispensável.

Para a próxima estratégia, foi realizada a remoção da região -35 foi (conforme Figura 11 em amarelo), de todas as sequências a serem testadas (retirados cerca de 8 pb), então o *pdC* foi reduzido para 138 pb.

Como não há uma definição do sítio de ligação da RNA polimerase em *Z. mobilis*, foi testada toda a sequência entre o TSS e a região promotora, conforme Conway, *et al.* (1987). Uma sequência localizada entre as regiões -10 e -35, nomeada neste estudo como região intermediária (RI), contendo 11 pb foi testada. Para uma das construções (*Ppdc*₁₃₈-10 orig RI) foi mantido o formato original da região -10 e da região RI e na outra

construção foi realizada mutação na região RI (*Ppdc*₁₃₈ -10 Δ RI), onde os 11 pb foram substituídos por C (citosina).

TCTAGAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTGGCATCTTTTAAAA
 ATGCCTATAGC **TAATCCGG** AACGACACTTT **AGAGGTTT** CTGGGTCATCCTGATTCAGACATAGT
 GTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATG

Figura 11. Sequência *Ppdc*₁₄₆, com as regiões -35, RI e -10. Região -35 – amarelo; região intermediária (RI) – cinza; Região -10 – rosa.

A Figura 12 abaixo, apresenta a estratégia desenhada para a construção dos plasmídeos, estes foram utilizados para realização de citometria de fluxo para determinação das regiões -10 e -35 do promotor *pd*c de *Z. mobilis*.

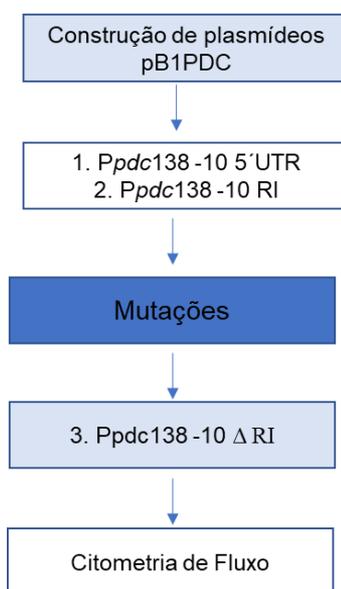


Figura 12. Construção de plasmídeos para identificação das regiões -10 e -35 do promotor *pd*c de *Z. mobilis*. A construção 1 foi feita com *Ppdc* 138 pb, contendo a região -10 original e a região 5' UTR. A construção 2 continha *Ppdc* com 138 pb, região -10 e região intermediária (RI) originais. Após foi realizada uma mutação na região intermediária, continuando com *pd*c 138 pb e região -10 original.

Sequências:

1. *Ppdc*₁₃₈, -10, 5'UTR – sequência contendo *pd*c 138 pb, região intermediária (cinza), região -10 (rosa) e região 5'UTR (azul claro)

TCTAGAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTGGCATCTTTTAAAA
ATAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTCAGACATAGT
GTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATG

2. Ppdc 138 pb, região intermediária (RI) cinza e região -10 em rosa

TCTATTGATATTTTTCCTCTAAAAAAGATAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATC
ATGAACAAAAATTGGCATCTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGT
TTCTCATATG

3. Ppdc138, região intermediária (RI) cinza, região -10 mutada em amarelo,
5'UTR em azul claro.

TCTAGAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTGGCATCTTTTAAAA
ATAACGACACTTTCCCCCCCCTGGGTCATCCTGATTCAGACATAGT
GTTTTGAATATATGGAGTAAGCATATG

As construções realizadas foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5 alfa, logo em seguida JM110 e após transformar *Z. mobilis*. A cultura de 3 clones de *Z. mobilis* modificada foram cultivados, levados ao citômetro de fluxo para análise da expressão do gene *eGFP* através de fluorescência.

No entanto, não foi obtido sucesso com esses clones na análise realizada por citometria de fluxo. Não foi verificada diferenças significativas na expressão do gene *eGFP* entre os clones testados. Esse resultado sugere que a região -10 do promotor *pdc* de *Z. mobilis* não seja responsável no processo de transcrição, porém a região -35 seria indispensável.

Por este motivo, a sequência do *pdc* foi analisada novamente e montada uma nova estratégia. Foram definidas novas regiões a serem testadas, pois até o momento somente estudos *in silico* fornecem dados sobre as possíveis regiões -10 e -35 de *pdc* de *Z. mobilis*, bem como a possível região de início da transcrição. A informação através de dados experimentais é fundamental para a obtenção de informações mais precisas sobre o promotor *pdc* de *Z. mobilis*.

6.1. Mutações nas regiões -10 e -35 do promotor *pdc*

- Estratégia II – Mutações

Os oligonucleotídeos utilizados nessa etapa foram sintetizados pela empresa Exxtend. Os mesmos foram preparados, anelados e ligados ao plasmídeo pB1PDC já anteriormente digerido com a enzima de restrição XbaI utilizando sistema *Infusion*. A estratégia está descrita na Figura 13.

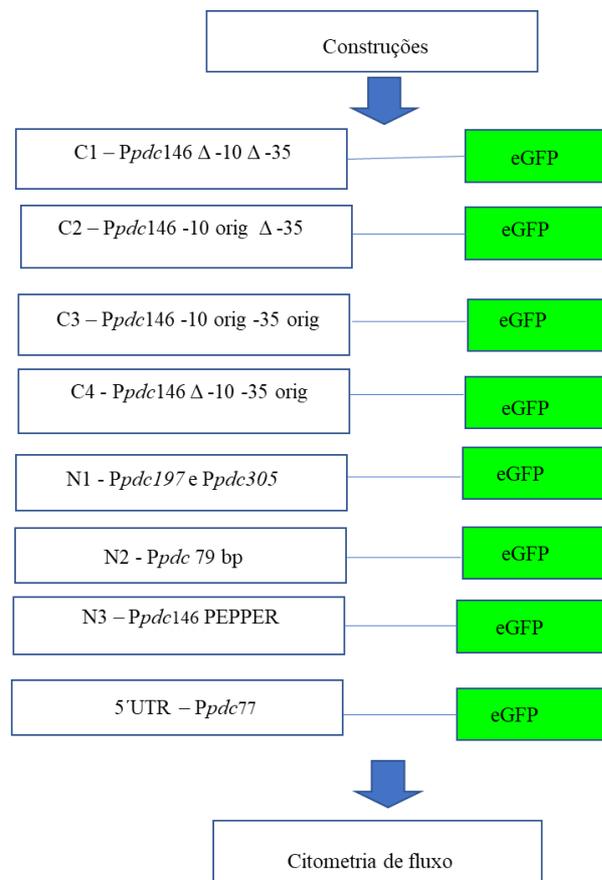


Figura 13. Estratégia para definição das regiões -10 e -35 e identificação da sequência de início da transcrição. C1, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com mutações de 8 pb nas regiões -10 e -35. C2, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 original e mutações de 8 pb na região -35. C3, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 e -35 originais. C4, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 com 8pb mutados e região -35 original. N1, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com a região localizada entre *Ppdc*197 e 305. N2, construção com

plasmídeo pB1PDC, com *Ppdc* contendo 79 pb. N3, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região fornecida através da análise realizada pelo *software PePPER*. 5'UTR *Ppdc* 77, construção com plasmídeo pB1PDC contendo somente a região 5'UTR.

Para realização das mutações foram escolhidas as possíveis regiões determinadas para as sequências -10 e -35, essas foram baseadas nas mesmas regiões apontadas nos estudos de Conway *et al.*, (1987) e Barnell *et al.*, (1992). Foi realizada dessa forma para confirmar ou refutar os resultados desses autores, visto que até o momento não se tem conhecimento de resultados experimentais que conformem os resultados prévios obtidos *in silico*.

Sequências dos oligonucleotídeos sintetizados que foram usados nessa etapa:

C1	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG TCATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAG CAATGAGTTAT
C2	GCCTAGGGGGGGTCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGG GTCATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAA GCAATGAGTTAT
C3	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG TCATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAG CAATGAGTTAT
C4	GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTGGGGGGGGTC TGGGTCATCC
N1 -F	CGGTGGCGGCCGCTCTAGACCTTTTTAAGGTGTCCCGTTCCT TTTTCCCTTTTTGGAGGTTGGTTATGTCTATAACTTAAT CCAGAAACGGGCGTTTAG
N1 -R	GCCGAAGCGAAAAGACTAAACAACCATGATGGACAAAGCTA AACGCCGTTTCTGGATTAAGTGATTATAGGACATAACCAAC CTCCAAAAGGGGAAAAGGAACGGGACACCTTGAAAAG GTCTAGAGCGGCCGCCACCG
N2 -F	CGGTGGCGGCCGCTCTAGACCTTTTTAAGGTGTCCCGTTCCT TTTTCCATCATGGTTGTTTAGTCTTTTCGCTT
N2 -R	GCCGAAGCGAAAAGACTAAACAACCATGATGGAAAAGGA ACGGGACACCTTGAAAAGGTTCTAGAGCGGCCGCCACCG

N3 - F	CGGTGGCGGCCGCTCTAGCCCTTTTGGAGGTTGGTTATGTCC TATAATCACAGTCTTTTCGCTTCGGC
N3 -R	GCCGAAGCGAAAGACTGTGATTATAGGACATAACCAACCTC CAAAAGGGCTAGAGCTAGAGCGGCCGCCACCG

Para as mutações das regiões -10 e -35 foi utilizado o fragmento de 146 pb do promotor *pdc*. Para os controles negativos foram construídos plasmídeo sem *eGFP* e sem o promotor.

Na construção do ZM 5'UTR, a região 5'UTR foi amplificada com *eGFP* e ligada ao plasmídeo pB1PDC digerido com XbaI. Foi mantido sítio de restrição XbaI e a sequência 5'UTR foi utilizada como cauda do oligonucleotídeo.

As construções foram feitas conforme apresentado no esquema da Figura 13, onde foram mantidas as regiões -10 e -35 originais (C3), *pdc* com 146 pb (*Ppdc*₁₄₆), efetuando mutagênese de ambas as regiões -10 e -35 (C1 com *Ppdc*₁₄₆), mutando somente a região -10 (C4 com *Ppdc*₁₄₆), mutando somente a região -35 (C2 com *Ppdc*₁₄₆), reduzindo o *Ppdc*₁₄₆ para 79 pb (N2 com *Ppdc*₇₉), mantendo a região entre o *Ppdc*₁₉₇ e *Ppdc*₃₀₅ (N1 com *Ppdc*₁₄₆), utilizando sequência fornecida pelo *Software PePPER* (N3 com *Ppdc*₁₄₆) e mantendo somente a região 5'UTR (5'UTR com *Ppdc*₇₇). As sequências de 8 pb que foram mutadas foram substituídas por citosina (C).

A sequência do promotor *pdc* de *Z. mobilis* foi analisada pelo *software PePPER*, onde foi definida pelo *software* uma possível região reguladora. No entanto, quando essa sequência foi utilizada na construção do plasmídeo e analisada por citometria de fluxo, não foi detectada expressão do gene *eGFP*. Com isso, observa-se que a região definida pelo *software* não se trata de uma sequência reguladora, assim, confirma-se que a proposta *in silico* nem sempre é validada pelo método experimental.

Os controles negativos e positivos podem ser observados na Figura 14. Os controles negativos utilizados nesta estratégia foram os mesmos utilizados na estratégia apresentada no Capítulo I, onde D (sem *eGFP*), V2 (sem *pdc*) e PV (plasmídeo vazio). Para os controles positivos foram utilizados o *pdc* 146 pb, que apresentou o mínimo de fluorescência observada na citometria de fluxo descrita no capítulo I, o outro controle positivo utilizado foi com *pdc* 505 pb, este apresentou o máximo de fluorescência observada na citometria de fluxo descrita no capítulo I, com o gene *eGFP*.

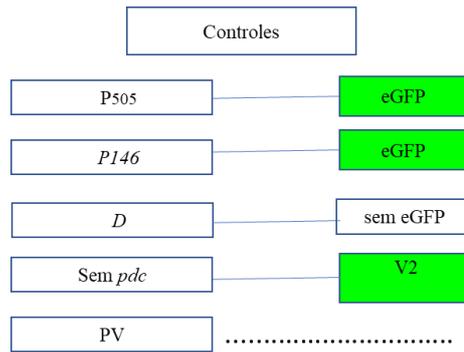


Figura 14. Controles positivos e negativos utilizados nesta estratégia. P₅₀₅, controle positivo – plasmídeo com promotor *pd*c contendo 505 pb dirigindo a expressão do gene *eGFP*. P₁₄₆, controle positivo - plasmídeo com promotor *pd*c contendo 146 pb dirigindo a expressão do gene *eGFP*. D, controle negativo, plasmídeo com promotor *pd*c 505 pb, porém sem o gene *eGFP*. V2, controle negativo – plasmídeo contendo gene *eGFP*, porém sem promotor *pd*c. PV, controle negativo, plasmídeo sem *pd*c e sem *eGFP*.

6.2. Resultados de citometria de fluxo

Todas as linhagens construídas foram preparadas conforme metodologia descrita anteriormente para realização de verificação de fluorescência em citômetro de fluxo, da mesma marca e com os mesmos parâmetros já citados.

Nas Figura 15 e 16 estão apresentados os resultados obtidos pela análise de citometria de fluxo, onde todos os clones foram analisados em triplicata e aplicada análise estatística ANOVA. As linhagens N1, N2 e N3 não foram capazes de expressar a fluorescência do gene *eGFP*, permanecendo com os mesmos valores de fluorescência dos controles negativos (V2, D e PV). Com isso, através desse resultado, pode-se sugerir que as regiões analisadas nessas construções parecem não ser importantes no processo de transcrição, pois não foi observada fluorescência de eGFP.

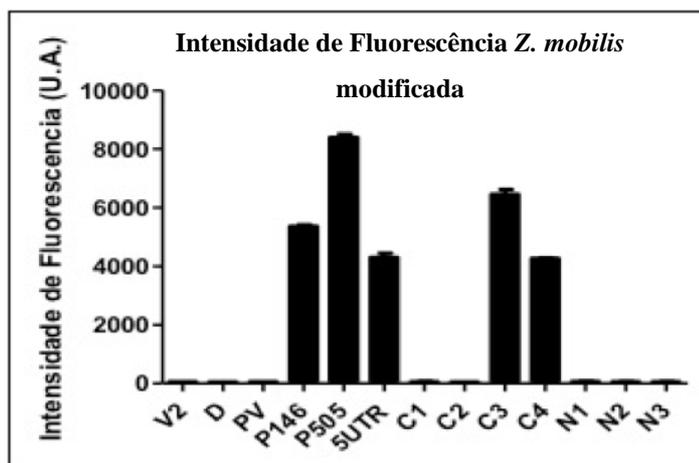


Figura 15. Gráfico com resultados das análises de intensidade de fluorescência. V2, D e PV são os controles negativos. P146, construção contendo pB1PDC com *pdc* 146 pb, P505, construção contendo pB1PDC com *pdc* 505 pb. 5UTR *Ppdc* 77, construção com plasmídeo pB1PDC contendo somente a região 5'UTR. C1, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com mutações de 8 pb nas regiões -10 e -35. C2, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 original e mutações de 8 pb na região -35. C3, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 e -35 originais. C4, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 com 8pb mutados e região -35 original. N1, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com a região localizada entre *Ppdc*197 e 305. N2, construção com plasmídeo pB1PDC, com *Ppdc* contendo 79 pb. N3, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região fornecida através da análise realizada pelo *software* PePPER.

Resultados de Citometria de Fluxo em *Z. mobilis* modificada

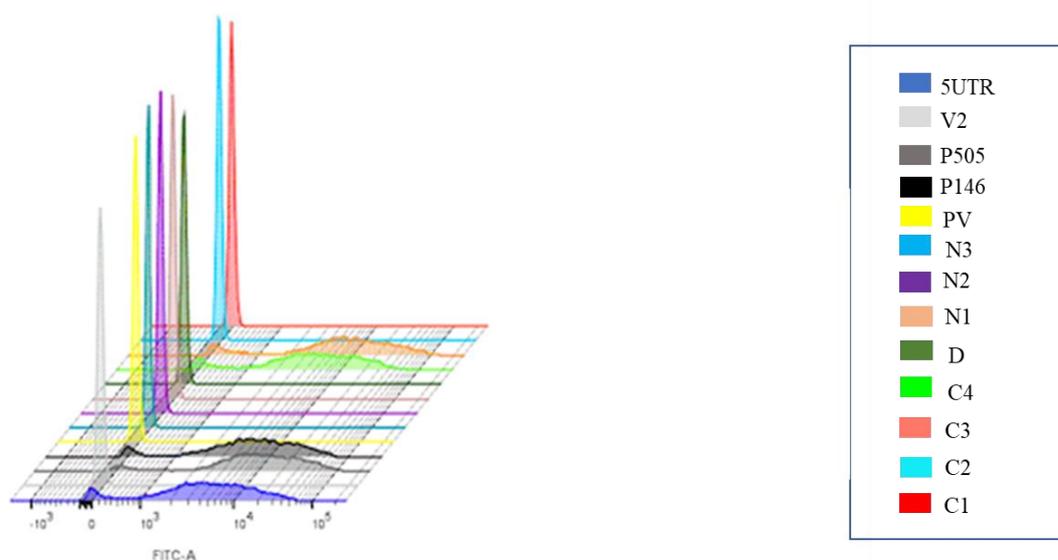


Figura 16. Gráfico com dados de Citometria de Fluxo. Expressão da fluorescência do gene *eGFP* em *Z. mobilis* modificada. 5UTR – Plasmídeo sem *pdc*, com 5'UTR. V2 – controle negativo - plasmídeo contendo gene *eGFP*, porém sem promotor *pdc*. P505 – plasmídeo com *pdc* 505 pb. P146 - plasmídeo com *pdc* 146 pb. PV - controle negativo, plasmídeo sem *pdc* e sem *eGFP*. N3, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região fornecida através da análise realizada pelo *software PePPER*. N2, construção com plasmídeo pB1PDC, com *Ppdc* contendo 79 pb. N1, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com a região localizada entre *Ppdc*197 e 305. D, controle negativo, plasmídeo com promotor *pdc* 505 pb, porém sem o gene *eGFP*. C4, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, C3, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 e -35 originais. C2, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com região -10 original e mutações de 8 pb na região -35. C1, construção com plasmídeo pB1PDC contendo *Ppdc* 146 pb, com mutações de 8 pb nas regiões -10 e -35.

Na construção C1 (regiões -10 e -35 mutadas) e C2 (mutação da região -35), não foi observada expressão da proteína *eGFP*. Na construção C3, onde as regiões -10 e -35 foram mantidas em seu formato original a incidência de fluorescência não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle positivo contendo *Ppdc*₁₄₆. Porém, a construção C3 teve diferença significativa quando comparada com as construções que não obtiveram fluorescência (C1, C2, N1, N2 e N3).

No entanto, quando a região -10 foi mutada e a região -35 foi mantida em sua forma original, houve uma diminuição da expressão de fluorescência, porém, ainda assim, foi observada a expressão de *eGFP*, sugerindo que a possível região de início da transcrição possa estar localizada próxima a região -35 do promotor *pdc* de ZM.

No entanto, neste estudo foi possível verificar que a mutação realizada na região -35 foi capaz de inibir totalmente a expressão de fluorescência de *eGFP*, sugerindo que a região -35 é importante na etapa de expressão, podendo estar ligada ao início do processo de transcrição de *Z. mobilis*. No entanto, quando a região -10 foi mutada na linhagem C4 ainda se obteve expressão significativa de *eGFP*, não mostrando diferença significativa com o controle *Ppdc₁₄₆* que é a linhagem que contém o menor fragmento do promotor em *Z. mobilis*. Com isso, pode-se concluir que a região -10 não seria tão importante na etapa de expressão e não seria a possível região de início de transcrição em *Z. mobilis*. Nesse ponto poderíamos discordar de Conway *et al.*, 1987, quando afirmou que a região -10 de *Z. mobilis* seria a mesma de *E. coli*.

Observa-se que quando ZM foi modificada com o cassete de expressão contendo somente a região 5'UTR e o fragmento do promotor ficou com 77pb (correspondentes ao 5'UTR) foi obtida fluorescência, e este resultado de fluorescência foi muito próximo a fluorescência emitida pelo *Ppdc₁₄₆*, menor tamanho de fragmento de *pdc* com atividade. Estes resultados podem confirmar os estudos realizados por Cho *et al.*, (2017), onde os autores afirmam ter observado efeito regulatório de 5' UTR quando *Z. mobilis* foi colocada sob condições elevadas de etanol, xilose e acetato, sendo este um fator regulador potencial de resposta geral ao estresse (CHO *et al.*, 2017). Toledo-Arana *et al.*, (2009), verificaram em seus estudos que o 5'UTR responde com uma mudança estrutural em *Listeria monocytogenes* após a bactéria sofrer alterações de temperatura, o que se torna crítico a sobrevivência de bactérias patogênicas no hospedeiro. Em *E. coli* o 5'UTR do gene *alx* (sensor de pH em *E. coli*) altera sua estrutura em condições alcalinas de pH para que ocorra a tradução do gene *alx* (Nechooshtan *et al.*, 2009). Portanto a região 5'UTR em várias bactérias tem função de regulação gênica, principalmente quando ocorrem situações ambientais que possam causar algum estresse nesse micro-organismo, assim os 5'UTR podem detectar e responder rapidamente a essas alterações ambientais, eles são responsáveis em regular as mudanças na expressão gênica e na atividade das proteínas de bactérias (CHO *et al.*, 2017).

7.0 Capítulo III - Construção de Sondas para análise por EMSA, Supershift e Western Blotting para identificar as sequências -10 e -35 de *pdc*

- **Estratégia**

Foram construídas 5 sondas, conforme apresentado na Figura 16, as quais foram sintetizadas pela empresa Exxtend. As sondas foram aneladas conforme método de anelamento e testadas com o extrato total de ZM por EMSA, *Supershift* e *Western Blotting* (Figura 17). Essas análises foram utilizadas para localizar e definir as sequências das regiões -10 e -35 do *pdc* de *Z. mobilis*, bem como localizar a região de ligação da Sigma 70 com a DNA polimerase.

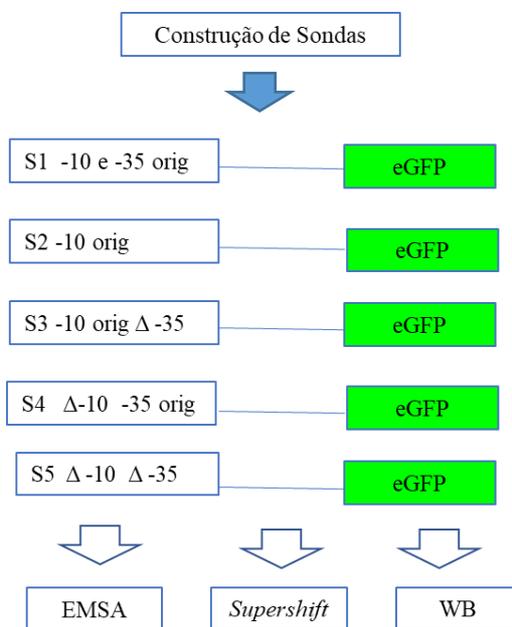


Figura 17. Construção de sondas para análise pelo método de EMSA, *Supershift* e *Western Blotting*.

S1 – Sonda 1 contendo fragmento -10 e -35 originais,

S2 – Sonda 2 contendo somente a região -10,

S3 – Sonda 3 contendo a região -10 original e a região -35 mutada em 8 pb (sequência de 8pb substituída por C – citosina),

S4 – Sonda 4 contendo a região -10 mutada em 8 pb (substituídas por C – citosina) e -35 original,

S5 – Sonda 5 contendo as regiões – 10 e -35 mutadas 8 pb (substituídas por C – citosina).

As sondas foram construídas contendo marcação na região 5' com 5-Carboxifluoresceína (5-FAM), sondas quentes, para realização de EMSA, para detectar a ligação entre o elemento no DNA e a RNA polimerase - Sigma70. Foram construídas sondas sem a marcação com FAM, sondas frias, para determinação da especificidade da proteína.

As Sondas 3, 4 e 5 foram construídas contendo mutações nas regiões - ao e -35, onde 8 pb foram mutados e as sequências substituídas por citosina (C), conforme a Figura 18.

Query	1	TTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTAAAAATGCCT	60
Sbjct	1	TTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTAAAAATGCCT	60
Query	61	ATAcccccccccGGAACGCACTTTAGAGGTTTCTGGGTTCATCCTGATTGAGACATAGTGT	120
Sbjct	61	ATA-GCTAATCCGGAACGCACTTTAGAGGTTTCTGGGTTCATCCTGATTGAGACATAGTGT	119
Query	121	TTTG-AATATATGGAGTAAGCAATGAGTTAT	150
Sbjct	120	TTTGAAATATATGGAGTAAGCAATGAGTTAT	150

Figura 18. Mutação da região -35 do promotor *pd*c de ZM. Realizado alinhamento por Blast, onde a sequência *Query* é a sonda 3 que foi sintetizada, onde foi realizada a mutação de 8 pb da possível sequência da região -35 do promotor *pd*c de ZM4. A sequência *Sbjct*, se trata da sequência original do promotor *pd*c de ZM4, sem mutações.

7.1. Resultados obtidos pelo método de EMSA com a utilização das sondas construídas

Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) juntamente com sistemas de genes repórter são utilizados em vários estudos para determinar RNAs alvos e proteína in vivo e in vitro e elementos de ligação entre regiões promotoras (CORCORAN *et al.* 2012; TOMASSI *et al.* 2017).

Na Figura 19 observa-se a formação de algumas bandas no gel de poliacrilamida onde foi realizada a metodologia de EMSA. Neste primeiro gel apresentado foram testadas as sondas 1 e 2.

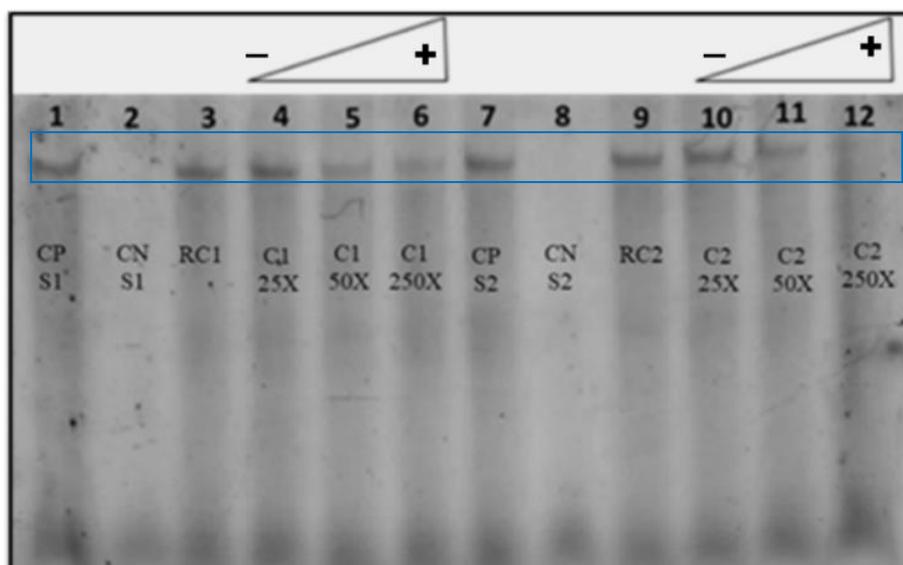


Figura 19. Gel de poliacrilamida utilizando o método de EMSA. Bandas formadas no gel (quadrado azul), resultado da possível ligação entre as sondas 1 e 2 com extrato de *Z. mobilis*.

1. CP – Controle positivo Sonda 1
 2. CNS1 - Controle negativo Sonda
 3. RC1 - Reação completa Sonda 1
 4. RC1 25 X – reação de competição Sonda 1 (sonda 1 fria 25X)
 5. RC1 50 X – reação de competição sonda 1 (sonda 1 fria 50X)
 6. RC1 250 X – reação de competição sonda 1 (sonda 1 fria 250X),
 7. CP – Controle positivo Sonda 2
 8. CN S2 - Controle negativo Sonda 2
 9. RC2 - Reação completa Sonda 2
 10. RC2 25 X- Reação competição sonda 2 (sonda 2 fria 25X),
 11. RC2 50 X - Reação competição sonda 2 – (sonda 2 fria 50X)
 12. RC2 250 X - Reação competição sonda 2 (sonda 2 fria 250X)
- ** sonda 1 (região -10 e -35 originais)
- ** sonda 2 (construída somente com a região -10)

Pode-se observar algumas bandas no gel de poliacrilamida, isso pode sugerir que há alguma interação entre a sondas 1(contendo fragmento -10 e -35 originais) e 2 (contendo somente a região -10) com as proteínas do extrato de *Z. mobilis*. Esse resultado sugere que as sequências presentes em ambas as sondas podem ser importantes para o processo de transcrição.

Os estudos *in silico* realizados por Conway *et al.*, (1987), indicam que as sequências -10 e -35 de *Z. mobilis* apresentam poucas regiões homólogas com a sequência consenso proposta para *E. coli* e afirmam que o sítio de iniciação de *Z. mobilis* não foi reconhecido por *E. coli* (BARNELL *et al.* 1992; CONWAY, SEWELL, *et al.* 1987; CONWAY, OSMAN, *et al.* 1987b)

Não foi obtido resultado conclusivo na localização das sequências -10 e -35 de ZM pelo experimento com EMSA e não foi possível localizar a sequência de início da transcrição. Assim, para complementar esse experimento foi realizada a metodologia de *Supershift* e de *Western Blotting*, estas foram realizadas para encontrar os elementos de ligação entre a RNA polimerase e a sigma 70 no promotor *pdC* de ZM.

Para realização do *Supershift* foi pesquisado no mercado um anticorpo monoclonal anti-RNA Polimerase Sigma 70, o anticorpo foi adquirido e os testes realizados. Porém, não foram obtidos resultados com estes experimentos, pois não houve reação no gel (não houve formação de banda de *Supershift*). Foi realizado *Western Blotting*, porém não foi observada reação, isto ocorreu, pois provavelmente o anticorpo anti-sigma 70 utilizado é de *E. coli* e não específico para *Z. mobilis* ou não reconheça as proteínas presentes no extrato total de *Z. mobilis*. Suspeita-se também que, a pureza do extrato bruto de *Z. mobilis* possa também interferido na obtenção dos resultados.

Neste, foram realizadas análises experimentais buscando comprovar os resultados encontrados nos estudos *in silico* realizados por Barnell *et al.* (1992); Conway *et al.* (1987); Conway *et al.* (1987b) e através dos resultados experimentais, até hoje não existentes, pode-se comprovar que as regiões -10 e -35 de *Z. mobilis* não podem ser consideradas as mesmas regiões estabelecidas para *E.coli*, confirmando assim os estudos realizados *in silico* (BARNELL *et al.* 1992; CONWAY, SEWELL, *et al.* 1987; CONWAY, OSMAN, *et al.* 1987b).

8.0 Conclusões e Perspectivas

Neste estudo foi realizada análise estrutural do promotor *pd*c, podendo se chegar as seguintes conclusões e perspectivas:

- Esse é um dos poucos estudos, ou um dos primeiros a ser realizado de forma experimental sobre o promotor *pd*c de *Z. mobilis*, as possíveis regiões -10 e -35 e determinação da sequência de início da transcrição;
- Para realização de construções heterólogas, o promotor *pd*c de *Z. mobilis* com 305 pb pode ser utilizado ao invés do promotor com 505 pb. Esse resultado poderá auxiliar as pesquisas futuras, pois pode auxiliar na estabilidade das construções em *Z. mobilis*, visto que essa bactéria pode ter comportamento instável dependendo do tamanho do plasmídeo.
- O menor fragmento com atividade promotora possui 146 pb. Até hoje não foi apresentado um menor fragmento de *pd*c ativo em *Z. mobilis*. Esse resultado pode colaborar com futuros estudos na pesquisa da localização da sequência responsável pela transcrição em *Z. mobilis* ;
- Entre as regiões - 197 e - 305 há uma região regulatória do promotor *pd*c de *Z. mobilis*, este resultado irá auxiliar nas pesquisas futuras que poderão identificar a presença de outras possíveis regiões regulatórias no promotor *pd*c de *Z. mobilis*;
- Através de mutações realizadas nas regiões -10 e -35 do promotor *pd*c de *Z. mobilis*, sugere-se que a região -35 é a região mais importante para o reconhecimento da RNA polimerase. Sugere-se que sejam realizados novos estudos na possível região -35 de *Z. mobilis* para identificar a sequência exata de reconhecimento da RNA polimerase e aprofundamento dessas informações;
- Foi possível confirmar que a região 5'UTR possui uma sequência regulatória e participa do processo de transcrição, conformando assim, estudos anteriores realizados;

- Apesar dos estudos *in silico* trazerem muitas informações sobre a estrutura de promotores, é necessário que sejam realizadas análises experimentais, para que as informações *in silico* sejam confirmadas. Portanto, sugere-se que mais análises experimentais sejam realizadas, para que possam definir as regiões -10 e -35 de *Z. mobilis* e localizar a sequência de início da transcrição no promotor *pdC*. Para isso, é necessário que seja encontrado um anticorpo que possa reagir com a RNA polimerase de *Z. mobilis* para que seja possível realizar com sucesso a metodologia de *Supershift* e *Western Blotting*;
- Para estudos futuros, sugere-se a purificação do extrato de *Z. mobilis*, para que não ocorra interferência de fatores não específicos;
- Confirmando resultados anteriores citados na literatura, é importante rever a ideia preconcebida de que todas as bactérias são iguais e possuem os mesmos elementos de ligação da RNA polimerase que *E. coli*, pois até hoje essa ideia ainda não teve comprovação experimental;
- O conhecimento destas regiões traz alternativas de manipulação genética para *Z. mobilis* que são de fundamental importância para a inovação biotecnológica. Podendo assim, *Z. mobilis* ser confirmada como micro-organismo promissor para utilização em diversos segmentos industriais na produção de bioprodutos.
- Produção de uma revisão bibliográfica sobre as ferramentas genéticas aplicadas em *Z. mobilis* para expressão heteróloga, enviada e aguardando aceite e posterior publicação.

9.0 Referências Bibliográficas

ABUD, A. K. D. S. *Estudo do controle de qualidade do processo de produção de l-asparaginase por Zymomonas Mobilis*. p. 220, 2005.

AGRAWAL, M.; MAO, Z.; CHEN, R. R. *Adaptation yields a highly efficient xylose-fermenting Zymomonas mobilis strain*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 777–785, 2011.

BARNELL, W. O. *et al.* *The Zymomonas mobilis glf, zwf, edd, and glk genes form an operon: Localization of the promoter and identification of a conserved sequence in the regulatory region*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 9, p. 2816–2823, 1992.

BURNETT, M. E.; LIU, J.; CONWAY, T. *Molecular characterization of the Zymomonas mobilis enolase (eno) gene*. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6548–53, out. 1992.

CARBONELLI, D. L. *et al.* *A plasmid vector for isolation of strong promoters in Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, n. 1, p. 75–82, 1999.

CHEN, C. *et al.* *Genome comparison of different Zymomonas mobilis strains provides insights on conservation of the evolution*. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195994, abr. 2018.

CHO, S. H. et al. Identification and characterization of 5' untranslated regions (5'utrs) in *Zymomonas mobilis* as regulatory biological parts. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 2017.

CONWAY, T. et al. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 949–954, 1987a.

CONWAY, T. et al. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. **J Bacteriol.**, v. 169, n. 6, p. 2591–2597, 1987b.

CONWAY, T. et al. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2591–2597, 1987c.

CONWAY, T. et al. **The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology.** *FEMS microbiology reviews*, 1992.

CONWAY, T.; SEWELL, G. W.; INGRAM, L. O. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing, and identification of promoter region. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5653–62, dez. 1987.

CONWAY, T., SEWELL, G.W., INGRAM, L. O. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene from. v. 169, n. 12, p. 5653–5662, 1987.

DEANDA, K. et al. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4465–4470, 1996.

DOELLE, H. W. et al. *Zymomonas mobilis*. Science and industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 57–98, 1993.

EDDY, C. K. et al. Differential expression of gap and pgk genes within the gap operon of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 12, p. 6549–6554, 1989.

ERZINGER, G. S.; VITOLO, M. *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 131, n. 1–3, p. 787–94, 2006.

HE, M.-X.; FENG, H.; ZHANG, Y.-Z. Construction of a novel cell-surface display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 12, p. 2111–7, 2008.

J. SAMBROOK, E. F. F. Y T. M. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

JEFFRIES, T. W. Ethanol fermentation on the move. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 40–41, 2005.

K. M., Pappas, Universidade de Atenas. <https://jgi.doe.gov/why-sequence-zymomonas-mobilis-transcriptomes-and-resequencing-z-mobilis-industrial-strain-zm4/>, 2010

KANNAN, T. R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 3, p. 179–184, 1998.

KOVACH, M. E. et al. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques**, v. 16, n. 5, p. 800–802, 1994.

KURUMBANG, N. P. et al. Heterologous expression of a glycosyl hydrolase and cellular reprogramming enable *Zymomonas mobilis* growth on cellobiose. **PLoS one**, v. 15, n. 8, p. e0226235, 2020.

LEIGH, D.; SCOPES, R. K.; ROGERS, P. L. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 413–415, 1984.

LINGER, J. G.; ADNEY, W. S.; DARZINS, A. *Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6360–6369, 2010.

MORAIS, J. O. F. DE et al. *in the Pernambuco Federal University*. v. 31, p. 75–91, 1993.

MUNIZ, LB; ANDRADE, EV; ASTOLFI-FILHO, S. *Desenvolvimento de promotores para Escherichia coli a partir de síntese química de DNA*. v. 10, n. 1977, p. 89109, 2005.

NEALE, A. D. et al. *Pyruvate decarboxylase of Zymomonas mobilis: Isolation, properties, and genetic expression in Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 1024–1028, 1987.

NEALE, A. D. D. et al. *The two alcohol dehydrogenases of Zymomonas mobilis*. **European Journal of Biochemistry**, 1986.

ROGERS, P. L. et al. *Zymomonas mobilis for fuel ethanol and higher value products*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 263–288, 2007a.

ROGERS, P. L. et al. *Zymomonas mobilis for fuel ethanol and higher value products*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 263–288, 2007b.

ROSSI, J. J. et al. *Biological expression of an Escherichia coli consensus sequence promoter and some mutant derivatives*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 11 I, p. 3203–3207, 1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SCHMIDT, A. et al. *Effect of alcohols and temperature on the hopanoid content of Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 32–36, 1986.

SEO, J. S. et al. The genome sequence of the ethanogenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 63–68, 2005a.

SEO, J.-S. et al. The genome sequence of the ethanogenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 63–68, 2005b.

SPRENGER, G. A. a Catabolic Highway With Some Scenic Routes. v. 145, p. 301–307, 1996.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–46, 1977.

TAN, F. et al. Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 4, 2016a.

TAN, F. et al. Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 4, 2016b.

TODHANAKASEM, T. et al. Expression and Extracellular Secretion of Endo-glucanase and Xylanase by *Zymomonas mobilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 239–252, 2019.

UHLENBUSCH, I.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1360–6, maio 1991.

US 7989.206B2 – Patent – High expression *Zymomonas* Promoter, 2011

VERA, J. M., ET AL., 2020. Genome-Scale Transcription-Translation Mapping Reveals Features of. **Molecular Biology and Physiology**, v. 5, n. 4, p. 1–21, 2020.

VIKARI, L.; KORHOLA, M. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 471–476, 1986

WEISSER, P.; KRÄMER, R.; SPRENGER, G. A. Expression of the *Escherichia coli* *pmi* gene, encoding phosphomannose- isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4155–4161, 1996.

YANASE, H. et al. Purification, Crystallization, and Properties of the Extracellular Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 8, p. 1335–1337, 1992.

YANG, S. et al. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 893–894, out. 2009.

YANG, S. et al. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for 2,3-butanediol production from lignocellulosic biomass sugars. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

YANG, Y. et al. Prediction and characterization of promoters and ribosomal binding sites of *Zymomonas mobilis* in system biology era **Biotechnology for Biofuels**, 2019a

YANG, Y. et al. Identification and characterization of ethanol inducible promoters of *Zymomonas mobilis* based on omics data and dual reporter-gene system. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2019b.

YI, X.; GAO, Q.; BAO, J. Expressing an oxidative dehydrogenase gene in ethanologenic strain *Zymomonas mobilis* promotes the cellulosic ethanol fermentability. **Journal of Biotechnology**, v. 303, n. April, p. 1–7, 2019.

10. Anexo 1 – Resultados Sequenciamento

*Ppdc*₁₄₆

```

Query 59  TGCTTACTCCATATAT - CCTTACACTATGTCTGAATCAGGATGACCCAGAAACCTCTACA 117
          |||
Sbjct 514  TGCTTACTCCATATATTCAAAACACATGTCTGAATCAGGATGACCCAGAAACCTCTAAA 455

Query 118  GTGTCGTTCCGGATTTAGCTATAGGCATTTTTAAAAATGCCGAATTTTGTTCATGATGA 177
          |||
Sbjct 454  GTGTCGTTCCGGATTTAGCTATAGGCATTTTTAAAAATGCCGAATTTTGTTCATGATGA 395

Query 178  ACCTCTTCTGCCGAAGCGAAAAGAC 202
          |||
Sbjct 394  ACCTCTTCTGCCGAAGCGAAAAGAC 370

```

Sequência *Query* – Promotor *pdC* de *Z. mobilis* 146 pb.

Sequência *Subject* – sequência original do promotor *pdC* de ZM4.

Ppdc 197

```

Query 13  TCGCTCATGATCGCGCCTTTTTCTGATATTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAGTCTTTTC 72
          |||
Sbjct 318  TCGCTCATGATCGCGCATGTTCTGATATTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAGTCTTTTC 377

Query 73  GCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTAAAAATGCCTATAGC 132
          |||
Sbjct 378  GCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTAAAAATGCCTATAGC 437

Query 133  TAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTG 192
          |||
Sbjct 438  TAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTATCCTGATTCAGACATAGTGTTTTG 497

Query 193  AATATATGGAGTAAGCA 209
          |||
Sbjct 498  AATATATGGAGTAAGCA 514

```

Sequência *Query* – Promotor *pdC* de *Z. mobilis* 197 pb.

Sequência *Subject* – sequência original do promotor *pdc* de ZM4.

Ppdc 305

```
Query 1 ACCTTTTCAAGGTGTCCTCCGTTCTTTTCCCTTTTGGAGGTTGGTTATGTCCTATAA 60
      |||
Sbjct 209 ACCTTTTCAAGGTGTCCTCCGTTCTTTTCCCTTTTGGAGGTTGGTTATGTCCTATAA 268

Query 61 TCACTTAATCCAGAAACGGGCGTTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTATCGCTCATGAT 120
      |||
Sbjct 269 TCACTTAATCCAGAAACGGGCGTTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTATCGCTCATGAT 328

Query 121 CGCGACATGTTCTGATATTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAAGCTTTTCGCTTCGGCAGA 180
      |||
Sbjct 329 CGCGCATGTTCTGATATTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAAGCTTTTCGCTTCGGCAGA 388

Query 181 AGAGGTTTCATCATGAACAAAAATT-GGCATCTTTTAAAAATGCCATAGCTAAATCCGGA 239
      |||
Sbjct 389 AGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCAT-TTTTAAAAATGCCATAGCTAAATCCGGA 447

Query 240 ACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTGAGACATAGTGTGTTGAATATATGGA 299
      |||
Sbjct 448 ACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTGAGACATAGTGTGTTGAATATATGGA 507

Query 300 GTAAGCA 306
      |||
Sbjct 508 GTAAGCA 514
```

Sequência *Query* – Promotor *pdc* de *Z. mobilis* 3056 pb.

Sequência *Subject* – sequência original do promotor *pdc* de ZM4.

P405

```
Query 1 GGCCGTTTCATGACACCATTC-AAGAAATTTTAAACAGGCGTCTTCGGCTGCTTTCTTC 59
      |||
Sbjct 111 GGCCGTTTCATGACAAACAGCCGGAAAAATTTTAAACAGGCGTCTTCGGCTGCTTTAGGTC 170

Query 60 TCGGCTACGTTTCTACATCTGGTCTGATTCCCGGTTTACCTTTTCAAGGTGTCCTCGT 119
      |||
Sbjct 171 TCGGCTACGTTTCTACATCTGGTCTGATTCCCGGTTTACCTTTTCAAGGTGTCCTCGT 230

Query 120 CCTTTTCCCTTTTGGAGGTTGGTTATGTCCTATAATCACTTAATCCAGAAACGGGCG 179
      |||
Sbjct 231 CCTTTTCCCTTTTGGAGGTTGGTTATGTCCTATAATCACTTAATCCAGAAACGGGCG 290

Query 180 TTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTTATCGCTCATGATCGCGGATGTTCTGATATTTT 239
      |||
Sbjct 291 TTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTTATCGCTCATGATCGCGGATGTTCTGATATTTT 350

Query 240 CCTCTAAAAAAGATAAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAAGAGGTTTCATCATGAACAAAA 299
      |||
Sbjct 351 CCTCTAAAAAAGATAAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAAGAGGTTTCATCATGAACAAAA 410

Query 300 TTCGGCATTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG 359
      |||
Sbjct 411 TTCGGCATTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGG 470

Query 360 TCATCCTGATTCAGACATAGTGTGTTTGAATATATGGAGTAAGCA 403
      |||
Sbjct 471 TCATCCTGATTCAGACATAGTGTGTTTGAATATATGGAGTAAGCA 514
```

Sequência *Query* – Promotor *pdc* de *Z. mobilis* 405 pb.

Sequência *Subject* – sequência original do promotor *pdc* de ZM4.

P505

```

Query 26 TAATATCTGTAACAGCTCATTGATAAAGCCGGTCGCTCCTCGGGCAGTTTTGGATTGA 85
Sbjct 19 TAATATCTGTAACAGCTCATTGATAAAGCCGGTCGCTCCTCGGGCAGTTTTGGATTGA 78

Query 86 TCCTGCCCTGTCTTGTGGGAATTGATGAGGCCGTTTCATGACAACAGCCGAAAAATTT 145
Sbjct 79 TCCTGCCCTGTCTTGTGGGAATTGATGAGGCCGTTTCATGACAACAGCCGAAAAATTT 138

Query 146 AAAACAGGCGCTTCCTCGGCTGCTTTAGGTCTCGGCTACGTTTCTACATCTGGTCTGATTCT 205
Sbjct 139 AAAACAGGCGCTTCCTCGGCTGCTTTAGGTCTCGGCTACGTTTCTACATCTGGTCTGATTCT 198

Query 206 CCGGTTTACCTTTTTCAAGGTGTCCTGTTCTTTTTCCCTTTTTGGAGGTTGGTTATGT 265
Sbjct 199 CCGGTTTACCTTTTTCAAGGTGTCCTGTTCTTTTTCCCTTTTTGGAGGTTGGTTATGT 258

Query 266 CCTATAATCACTTAATCCAGAAACGGGCGTTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTTATCGC 325
Sbjct 259 CCTATAATCACTTAATCCAGAAACGGGCGTTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTTATCGC 318

Query 326 TCATGATCGCGCATGTTCTGATATTTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAGTCTTTTCGCTT 385
Sbjct 319 TCATGATCGCGCATGTTCTGATATTTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAGTCTTTTCGCTT 378

Query 386 CGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCAT - TTTAAAAATGCCTATAGCTAA 444
Sbjct 379 CGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCAT - GGCATCTTTAAAAATGCCTATAGCTAA 437

Query 445 ATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTGAGCATAGTGTGTTTGAAT 504
Sbjct 438 ATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTGAGCATAGTGTGTTTGAAT 497

Query 505 ATATGGAGTAAGCATATG 522
Sbjct 498 ATATGGAGTAAGCATATG 515

```

Sequência *Query* – Promotor *pd*c de *Z. mobilis* 505 pb.

Sequência *Sbjct* – sequência original do promotor *pd*c de ZM4.

Ppd_c 79 pb

```

Query 27 AGTCCTTTTCGCTTCGGCAGAAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCAT - TTTAAAAAA 85
Sbjct 366 AGTCCTTTTCGCTTCGGCAGAAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCAT - GGCATCTTTAAAAAA 424

Query 86 TGCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTGAGACA 145
Sbjct 425 TGCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTGAGACA 484

Query 146 TAGTGTGTTTGAATATATGGA 165
Sbjct 485 TAGTGTGTTTGAATATATGGA 504

```

Sequência *Query* – Promotor *pd*c de *Z. mobilis* 79 pb.

Sequência *Sbjct* – sequência original do promotor *pd*c de ZM4.

Ppd_c146 5'UTR

```

Query 1 GGGTCATCCTGATT CAGACATAGTGT TTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGGTGAGC 60
Sbjct 106 GGGTCATCCTGATT CAGACATAGTGT TTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATGGTGAGC 165
Query 61 AAGGGCGAGGAGCTGTT CACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA 120
Sbjct 166 AAGGGCGAGGAGCTGTT CACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA 225
Query 121 AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG 180
Sbjct 226 AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG 285
Query 181 ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGACC 240
Sbjct 286 ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGACC 345
Query 241 ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC 300
Sbjct 346 ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC 405
Query 301 TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC 360
Sbjct 406 TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC 465
Query 361 GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGC 420
Sbjct 466 GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGC 525
Query 421 ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG 480
Sbjct 526 ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG 585
Query 481 TACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG 540
Sbjct 586 TACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG 645

```

Sequência *Query* – Promotor *pd*c de *Z. mobilis* 146 pb com 5´UTR.

Sequência *Sbjct* – sequência original do promotor *pd*c de ZM4.

P197 e P305

```

Query 368 AAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCAT - TTTTAAAA 426
Sbjct 6 AAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATT -GGCATCTTTTAAAA 64
Query 427 ATGCCATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTAGAC 486
Sbjct 65 ATGCCATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTAGAC 124
Query 487 ATAGTGT TTTGAATATATGGAG 508
Sbjct 125 ATAGTGT TTTGAATATATGGAG 146

```

Sequência *Query* – Promotor *pd*c de *Z. mobilis* 197 e 305.

Sequência *Sbjct* – sequência original do promotor *pd*c de ZM4.

Ppdc146 -35 e -10 originais

```

Query 113 GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTCAGACAT 172
          |||
Sbjct 7   GCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTCAGACAT 66
          |||

Query 173 AGTGT TTTTGAATATATGGAGTAAGCA 198
          |||
Sbjct 67  A--GTTTTGAATATATGGAGTAAGCA 90
          |||

```

Sequência *Query* – Promotor *pdC* de *Z. mobilis* com -35 e -10 originais.

Sequência *Subject* – sequência original do promotor *pdC* de ZM4

Ppdc146 -35 mutado e -10 originais

```

Query 1   TTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATT TTTTAAAAATGCCT 60
          |||
Sbjct 1   TTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATT TTTTAAAAATGCCT 60
          |||

Query 61  ATAcccccccccGGAACGCAC TTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTCAGACATAGTGT 120
          |||
Sbjct 61  ATA-GCTAATCCGGAACGCAC TTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTCAGACATAGTGT 119
          |||

Query 121 TTTG-AATATATGGAGTAAGCAATGAGTTAT 150
          |||
Sbjct 120 TTTGAAATATATGGAGTAAGCAATGAGTTAT 150
          |||

```

Sequência *Query* – Promotor *pdC* de *Z. mobilis* com -35 mutado -10 originais.

Sequência *Subject* – sequência original do promotor *pdC* de ZM4

Foi construída na sequência a Sonda 4, Figura 19, onde a região -10 do promotor *pdC* foi mutada, para verificar se haveria ligação da Sigma 70 com a região -10 do promotor.

P146 com mutação na região -10

```

Query 1   TTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATT TTTTAAAAATGCCT 60
          |||
Sbjct 1   TTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATT TTTTAAAAATGCCT 60
          |||

Query 61  ATAGCTAATCCGGAACGCAC TTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTCAGACATAGTGT 120
          |||
Sbjct 61  ATAGCTAATCCGGAACGCAC TTTAGAGGTTTCTGGGTCATCCTGATTCAGACATAGTGT 120
          |||

Query 121 TTGAAATATATGGAGTAAGCAATGAGTTAT 150
          |||
Sbjct 121 TTGAAATATATGGAGTAAGCAATGAGTTAT 150
          |||

```

Sequência *Query* – Promotor *pdC* de *Z. mobilis* com -35 original e -10 mutada.

Sequência *Subject* – sequência original do promotor *pdC* de ZM4

