

Universidade Federal de São Carlos

Departamento de Engenharia Química - DEQ
Laboratório de Fábricas Celulares - LaFaC

Avaliação de vetores de expressão para *Xantomonas ssp.* aplicados á produção de goma xantana

Aluno: Richard Daniel Cruz
Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

São Carlos – SP
2022

RICHARD DANIEL CRUZ

**Avaliação de vetores de expressão para
Xantomonas ssp. aplicados á produção de goma
xantana**

Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do diploma de graduação de Bacharelado em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

São Carlos – SP
2022

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades, e permitir que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, além destes anos como universitário.

Agradeço aos meus pais, Sonia e Reginaldo, meus avós, Roberto e Maria, e também a todos os familiares que sempre me apoiaram durante toda minha caminhada. Um agradecimento especial a minha namorada Taynara Cavichioli por todo amor, carinho, compreensão, ajuda e refúgio desde o início do relacionamento e também durante todo esse período universitário.

Aos meus amigos de longa data Alice, Liniker e Welly, e também aos amigos que a universidade me proporcionou, Isabelle, Bruno, Fernando, Ana, Maria e Karina.

A Universidade Federal de São Carlos, seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade de realizar o curso de Biotecnologia e fornecer um ambiente de desenvolvimento pessoal e profissional.

A todos os professores que fizeram parte do meu processo de aprendizado ao longo dos anos da graduação. Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Adilson José da Silva, pela oportunidade de confiar em mim para realizar esse trabalho, por toda atenção, compreensão, paciência, apoio, disposição para sempre me ajudar, e por todo o conhecimento e experiência que passou a mim.

Aos meus colegas de laboratório, Josivan, Daniel, Davi, Gabriel e Fernando que sempre me ajudaram e tornaram o ambiente sempre descontraído e de grandes aprendizados,

À Prof. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, do Departamento de Genética e Evolução - UFSCar, e seus alunos, pelas contribuições ao trabalho, sugestões, as longas discussões e esclarecimentos, correções e ideias que ajudaram muito no desenvolvimento do projeto.

A Dra. Cíntia Regina Sargo e ao Dr. André Vessoni Alexandrini por aceitarem o convite de comporem a banca e fazerem parte da concretização dessa etapa da minha caminhada acadêmica.

Resumo

Xanthomonas ssp. são proteobactérias amplamente conhecidas pela sua associação patogênica às mais variadas espécies de plantas, como por exemplo a *Xanthomonas campestris*, causadora da podridão negra que acomete as crucíferas. Sua patogenicidade em partes é apoiada na produção de um biofilme que apresenta alta viscosidade, a goma xantana, e descobriu-se que a mesma apresenta propriedades que lhe permitiriam complementar gomas hidrossolúveis naturais e sintéticas, apresentando atividade emulsificante e espessante, demonstrando grande apreço para diversos setores da indústria. Infelizmente o Brasil não tem uma produção nacional do composto, ficando totalmente dependente das importações. Para tornar o processo de produção da goma cada vez mais atrativo e aprimorado é altamente relevante adentrar ao campo do desenvolvimento de linhagens otimizadas, o que vindo sendo pouco explorado. Contribuindo para mudar esse cenário, Kundlascht (2017) desenvolveu um modelo matemático determinístico que engloba as reações para a síntese dos monômeros da goma xantana, e a partir dele conseguiu identificar um gargalo nessa via com as reações catalisadas pelas enzimas UDP-Glicose pirofosforilase (UDPG-PP) e UDP-Glicose desidrogenase (UDPG-deH). Com esses resultados obtidos *in silico*, o presente trabalho buscou a validação dessa hipótese *in vivo*, clonando os genes para as enzimas UDPG-PP e UDPG-deH em vetores muito versáteis na construção de vias metabólicas, pertencentes a coleção *ePathBrick vectors*, baseados no sistema *Biobrick*. Inicialmente esses plasmídeos mostraram-se promissores para utilização no chassi de *Xanthomonas campestris* sub. *campestris* (XCC), mas ao longo dos experimentos não se apresentaram funcionais na bactéria, surgindo uma nova diretriz no trabalho, resultando na proposta de construção de plasmídeos para uso em XCC mantendo a versatilidade do esqueleto dos *ePathBrick Vectors*.

Abstract

Xanthomonas sp. are proteobacteria widely known for its pathogenic association with varied species of plants, such as *Xanthomonas campestris*, which causes black rot that affects crucifers. Its pathogenicity is partially supported by the production of a biofilm that has high viscosity, xanthan gum. This biopolymer has properties that allow it to complement natural and synthetic water-soluble gums, presenting emulsifying and thickening activity, showing great appreciation for several industry sectors. Unfortunately, Brazil doesn't have a national production of the compound, being totally dependent on imports. To make the gum production process more attractive and efficient, it is highly relevant to enter the field of development of optimized strains, which is being little explored. Contributing to change this scenario, Kundlascht (2017) developed a deterministic mathematical model that encompasses the reactions for the synthesis of xanthan gum monomers, and from it was able to identify a bottleneck in this pathway with the reactions catalyzed by the enzymes UDP-Glucose pyrophosphorylase (UDPG-PP) and UDP-Glucose dehydrogenase (UDPG-deH). With these results obtained *in silico*, the present work sought to validate this hypothesis *in vivo*, cloning the genes for the enzymes UDPG-PP and UDPG-deH in very versatile vectors used for the construction of metabolic pathways, belonging to the ePathBrick vectors collection, based on the Biobrick. Initially these plasmids showed promise for use in the chassis of *Xanthomonas campestris* sub. *campestris* (XCC), but throughout the experiments they were not functional in the bacterium. From this results, new objectives were set, resulting in the proposal to construct plasmids for use in XCC while maintaining the versatility of the ePathBrick vectors backbone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da goma xantana.....	13
Figura 2. Panorama do mercado global de goma xantana segundo o Global Market Insights.....	14
Figura 3. Principais exportadores da goma para o Brasil em 2019	14
Figura 4. Via de síntese das unidades dos açúcares precursores da goma xantana..	16
Figura 5. Modelo mecanístico da síntese de goma xantana em <i>Xanthomonas campestris</i>	16
Figura 6. Esquema de montagem das diferentes configurações possíveis para a via de interesse.	19
Figura 7. Esquema da clonagem individual do gene para UDPG-PP para montagem do plasmídeo pRSm4_PP.....	24
Figura 8: Esquema da clonagem individual do gene para UDPG-deH para montagem do plasmídeo pRSm4_deH.....	25
Figura 9. Gel de agarose resultante da reação de PCR do teste de eletroporação em XAC.....	31
Figura 10. Gel de agarose resultante da reação de PCR do teste de eletroporação em XCC utilizando colônias como molde.....	32
Figura 11. Gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos de PCR a partir de DNA genômico de XCC.....	33
Figura 12. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de digestão para posterior montagem dos plasmídeos de interesse.....	34
Figura 13. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de PCR de colônia.....	34
Figura 14. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de PCR de colônia.....	35
Figura 15. Recorte do esquema do plasmídeo pETM8.....	36
Figura 16. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de PCR de colônia para construção do plasmídeo pRSM5.....	36
Figura 17. Géis de agarose resultantes da eletroforese das reações de PCR de colônia para confirmação da montagem dos plasmídeos pRSM5_mc, pRSM5_PP e pRSM5_deH.....	37

Figura 18. Gel de agarose resultado da eletroforese das reações de PCR de colônias de XCC resistentes a Canamicina. 1-8 colônias de XCC resistentes a Canamicina..	40
Figura 19. Resultado obtido após teste de alinhamento da sequência do genoma de <i>Xanthomonas campestris sub. campestris</i> ATCC 33913 com a sequência do plasmídeo pRSM4.....	40
Figura 20. Esquema de uma inserção de gene pelo mecanismo de non homologous end joining (NHEJ).....	41
Figura 21. Recorte do esquema do plasmídeo pRSM4 destacando as enzimas de restrição BssSal e Pcil escolhidas para realizar a inserção do novo fragmento de DNA.....	44
Figura 22. Esquema da nova região contendo a nova ori pSa e os genes para RepA e ParAB.....	45
Figura 23. Esquema do plasmídeo proposto pSAM1.....	45
Figura 24. Esquema de montagem do plasmídeo pela técnica de CPEC.....	46
Figura 25. Esquema do plasmídeo proposto pXAN.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de antibiótico utilizadas para cada plasmídeo.....	23
Tabela 2. Sequência de primers utilizados.....	26
Tabela 3. Parâmetros para PCR.....	26
Tabela 4. Plasmídeos utilizados e construídos.....	28
Tabela 5. Insertos propostos com suas respectivas enzimas de restrição para manipulação.....	46
Tabela 6. Sequência dos primers para geração das extremidades complementares para CPEC.....	47
Tabela 7. Montagem da reação de CPEC.....	48
Tabela 8. Parâmetros da reação de CPEC.....	48

SUMARIO

1. Introdução	10
2. Objetivos	11
3. Revisão bibliográfica.....	12
3.1. Goma Xantana.....	12
3.2. Panorama econômico para goma xantana.....	13
3.3. Via de biossíntese.....	14
3.4. Otimização racional do sistema.....	17
3.5. <i>ePathBrick vectors</i> e sequência CAP.....	18
3.6. <i>Xanthomonas campestris</i> como principal produtora de goma xantana.....	21
4. Material e métodos.....	22
4.1. Linhagens bacterianas.....	22
4.1.1 <i>Xanthomonas campestris sub. campestris</i>	22
4.1.2 <i>E.coli</i> DH5 α	22
4.2. Testes de resistência de antibióticos.....	22
4.3. Desenho de primers e simulações de PCR e clonagem.....	23
4.4. Clonagem das ORFs e construção dos plasmídeos.....	26
4.5. Técnicas de transformação e preparo de células competentes.....	28
4.6. Etapas de <i>Screening</i>	29
5. Resultados.....	30
5.1. Testes iniciais para escolha do plasmídeo.....	30
5.2. Recuperação dos genes de interesse.....	32
5.3. Montagem dos plasmídeos.....	33
5.4. Eletroporação e <i>Screening</i>	37
6. Proposta de construção de plasmídeos para uso em XCC.....	42
7. Conclusão.....	50
8. Referências.....	51
9. Anexos.....	54

1. Introdução

Xanthomonas ssp., membros da subdivisão das proteobactérias gram-negativas, são amplamente conhecidas pela sua associação patogênica às mais variadas espécies de plantas (VORHÖLTER *et al.*, 2008), várias delas de grande importância econômica, como por exemplo a *Xanthomonas citri*, acometendo as plantações de *Citrus*, causadora do cancro cítrico, e a *Xanthomonas campestris*, causando a podridão negra que acomete as crucíferas (QIAN *et al.*, 2005). Porém, olhando por outro ângulo, a estratégia de infecção e proteção dessas bactérias durante o processo de associação às plantas é em partes apoiado na produção de um biofilme, a goma xantana, que devido a sua viscosidade se relaciona ao dano causado no sistema vascular das plantas bloqueando o suprimento de nutrientes (NITSCHKE; RODRIGUES, 2000).

Por esta razão esse composto, que é um hétero-polissacarídeo, foi extensivamente estudado, e descobriu-se que o mesmo apresenta propriedades que lhe permitiriam complementar gomas hidrossolúveis naturais e sintéticas, apresentando atividade emulsificante e espessante por exemplo, podendo ser aplicada nos mais variados setores da indústria, como na produção de alimentos, cosméticos, extração de petróleo, produtos agropecuários, entre outras (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Logo, um composto que por um lado está envolvido com microrganismos potencialmente catastróficos para economia agrícola, pode também ser implementado para fins industriais, e auxiliar na produção de insumos dos mais variados setores. Dentro deste segmento, infelizmente, o Brasil ainda não produz goma xantana em nível industrial, apenas para pesquisa, sendo assim totalmente dependente da importação desse composto amplamente utilizado na indústria nacional.

O desenvolvimento de processos de produção da goma depende da otimização de fatores como meios de cultivo, condições operacionais e tecnologias

para recuperação do composto de interesse. No entanto, com o grande avanço na área de biotecnologia e engenharia metabólica, uma parte chave deste processo com potencial de elevar o patamar da produção de goma xantana, industrialmente - é o desenvolvimento de linhagens otimizadas. Nesse contexto, Kundlasch (2017), desenvolveu um modelo matemático determinístico para a síntese dos monômeros da goma xantana utilizando a linguagem de programação Python. O modelo foi validado com dados experimentais da literatura, e foi possível identificar as reações catalisadas por UDP-Glicose pirofosforilase (UDPG-PP) e UDP-Glicose desidrogenase (UDPG-deH) como sendo os gargalos da via de síntese dos monômeros da goma xantana. O presente trabalho foi um desdobramento desta pesquisa, buscando validar experimentalmente as previsões obtidas *in silico*.

2. Objetivos

2.1 Geral

O presente trabalho buscou a construção de vetores para *Xanthomonas campestris pv. campestris*, carregando os genes para as enzimas UDPG-PP e UDPG-deH, almejando uma maior produção de goma xantana através da superexpressão de ambos.

2.2 Específicos

- Avaliar se os vetores ePathBrick são funcionais em XCC;
- Avaliar se uma sequência otimizada da proteína CAP (*Catabolite Activator Protein*) de *E. coli* é funcional em XCC para favorecer a expressão de proteínas recombinantes nesta bactéria;
 - Clonar dos genes-alvo, primeiramente de maneira individual, no vetor escolhido;
 - Montar do vetor com sequência CAP e posterior clonagem dos genes de interesse nele;
 - Propor uma adaptação dos vetores ePathBrick que não foram funcionais em XCC para se tornarem funcionais.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Goma Xantana

Sintetizada por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, a goma xantana (Figura 1) é um polissacarídeo natural, que hoje possui grande relevância industrial e também já demonstra um potencial significativo em aplicações mais direcionadas, como entrega de drogas, tratamento de águas residuais, entrega de proteínas, engenharia de tecidos e embalagem de alimentos, tudo devido às suas excelentes propriedades físico-químicas, biodegradabilidade e não toxicidade, somando a busca de novas alternativas sustentáveis que nesse contexto envolvem novas estratégias baseadas em biopolímeros que mostram uma melhoria próspera na bioeconomia e biotecnologia (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017).

A goma xantana foi descoberta no *Northern Regional Research Center* do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos no ano de 1963 e rapidamente já passou a ser produzida em escala industrial no ano seguinte. O *United States Food and Drug Administration* (FDA) liberou a substância para utilização em alimentos sem limitação de quantidade, fato importante que demonstrou a segurança e necessidade do composto, levando em consideração que sua maior aplicabilidade está na indústria de alimentos (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011). Porém outras aplicações da goma xantana também chamam atenção e se mostram importantes em diversos setores de grande porte da indústria, como na área farmacêutica em que é utilizada como agente suspensor, estabilizante e emulsificante (JANI et al., 2014), na agropecuária como agente uniformizador de suspensões de fungicidas, herbicidas e inseticidas, e até aplicações na recuperação terciária de petróleo, especialmente em reservatórios que apresentam lençóis freáticos com altas concentrações de cloreto de sódio e íons divalentes (GHOUMRASSI-BARR et al. 2016). Ela é empregada como espessante em diversos produtos, incluindo produtos de limpeza, ácidos para remoção de ferrugem e tintas, além disso de maneira geral sua utilização é de especial importância em formulações baseadas em água, mais seguras e limpas que composições granuladas empedradas (ELSHAFEI et al., 2010). Todas essas aplicações advieram devido a suas

propriedades físico-químicas, como apresentar alta viscosidade em baixas concentrações, além de uma grande estabilidade, tanto diante de uma variação intensa de pH, quanto de temperatura, destacando-se frente a outros polissacarídeos industriais utilizados para os mesmos fins (ROSALAM et al., 2006).

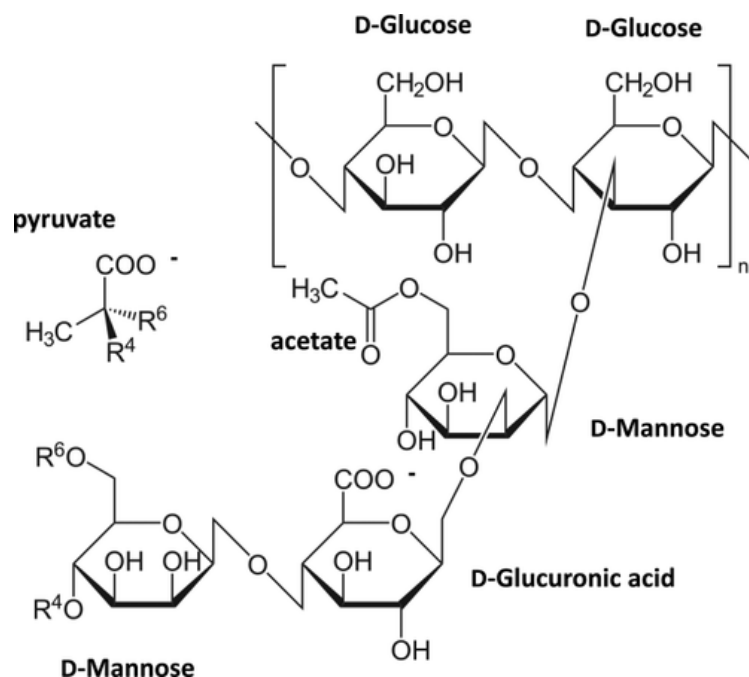


Figura 1. Estrutura química da goma xantana (Petri, 2015)

3.2 Panorama econômico para goma xantana

De acordo com relatório da empresa Global Market Insights, o mercado global de goma xantana atingiu a marca de mais de 960 milhões de dólares em 2019, com a previsão ultrapassar de USD 1,4 bilhões até 2026 (Figura 2). Dentro deste cenário infelizmente o Brasil não é um produtor de goma xantana voltada para o comércio, apenas para finalidade de pesquisa, sendo totalmente dependente de importações do composto. Em consulta à plataforma *online*, Comex Vis, disponibilizada pelo Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC), as importações brasileiras de Goma de Xantana em 2018 atingiram um patamar de 20,86 milhões de dólares. Dentre os principais exportadores da goma para o Brasil em 2019 (Figura 3) estão, em primeiro lugar a China com 60% do todo, seguida pela Áustria, França e Estados Unidos, com 18%, 11% e 8,6% respectivamente. Ainda há outros países que exportam o composto para o Brasil, mas

desempenham porcentagens pequenas, como Cingapura, Emirados Árabes Unidos, Hong Kong, Japão e Itália (MDIC, 2019).

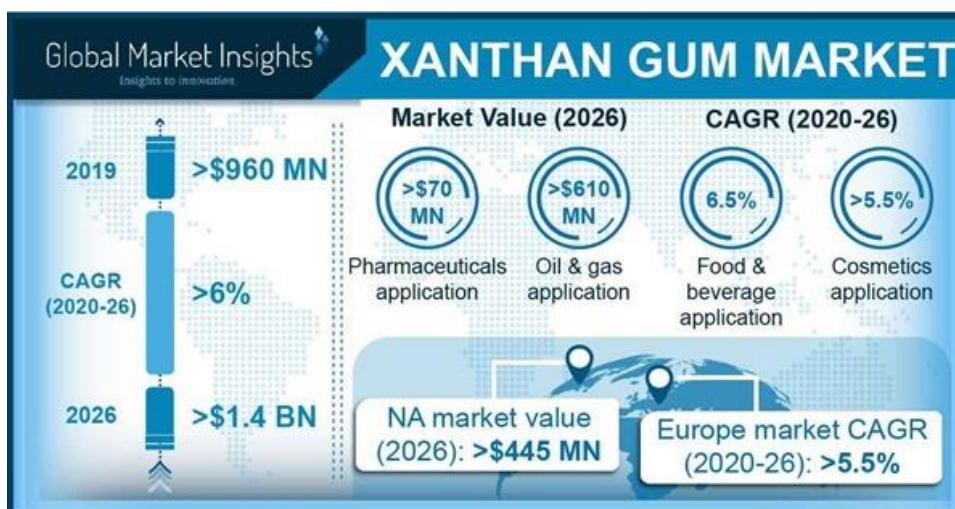
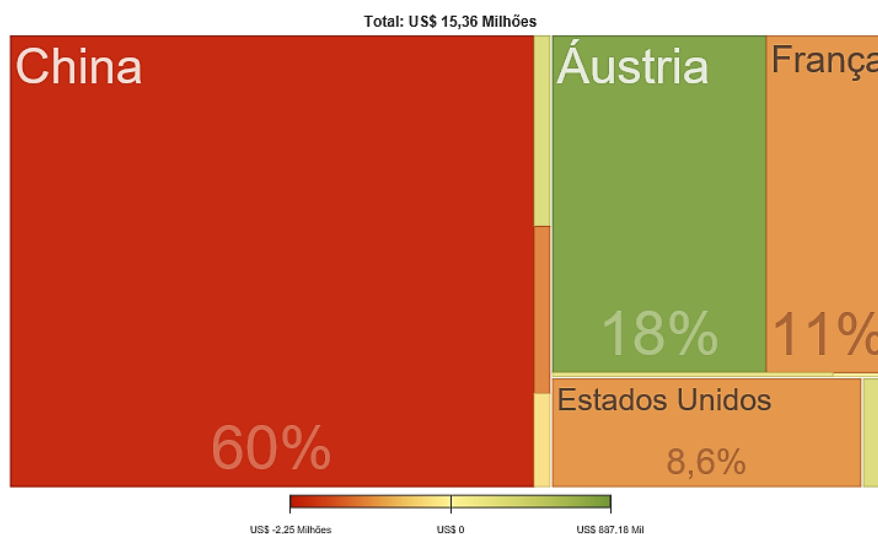


Figura 2. Panorama do mercado global de goma xantana segundo o Global Market Insights.



*Variações em relação ao mesmo período do ano anterior.

Figura 3. Principais exportadores da goma para o Brasil em 2019 (MDIC, 2019).

3.3 Via de biossíntese

Como observa-se na Figura 4, a goma xantana é um heteropolissacarídeo, composto por duas unidades de β -D-Glicose, duas α -D-

Manose, e um β -D-Ácido Glicurônico, o que a classifica como um pentassacarídeo, e estas unidades são derivadas a partir da via glicolítica com a glicose-6-fosfato como molécula precursora. A via de biossíntese pode ser dividida em duas etapas: a primeira, caracterizada pela síntese das unidades dos açúcares precursores (Figura 4), reações catalisadas por cinco enzimas (BECKER et al., 1998), e a segunda, a etapa de montagem da goma (Figura 5), com um cluster de 16kb e 12 fases de leitura aberta (ORFs), transcrito em operon, e localizado em região diferente no genoma daquela dos genes responsáveis pelas proteínas da produção dos precursores (HARDING et al., 1997).

A Figura 5 representa as reações sequenciais de adição de açúcares que formam a unidade de repetição do polímero, no qual o esquema geral de montagem da goma consiste primeiramente na reação da glicosiltransferase (GumD) transferindo um resíduo de glicose-fosfato de UDP-glicose (UDPglc) para um carreador de lipídeo localizado na face interna da membrana celular. Nas quatro etapas de reação subsequentes, GumM, GumH, GumK e GumI adicionam sequencialmente um segundo resíduo de glicose, dois de manose, e um resíduo de glucuronato que advieram de UDPglc, GDP-manose (GDPman) e UDP-glucuronato (UDPglcA) respectivamente, com isso forma-se a estrutura de carboidrato de uma unidade de repetição da goma xantana. A manose externa adicionada por último pode ser piruvilada por GumL, ambas as porções de manose podem ser especificamente acetiladas por GumF e GumG, respectivamente.

Finalizando as unidades de repetição elas são translocadas por GumJ para a face externa da membrana interna, então uma vez no periplasma, a unidade pode ser polimerizada por GumE que transfere polímeros de xantana imaturos para unidades de repetição recém-translocadas. Por último a goma xantana é exportada, envolvendo a proteína GumC que está ancorada na membrana interna com um domínio periplasmático substancial, e quando GumC entra em contato com a proteína da membrana externa GumB, que se presume ter um grande domínio periplasmático, os complexos de ambas as proteínas podem então formar poros abertos que permitem a exportação da goma xantana madura (VORHÖLTER et al., 2007).

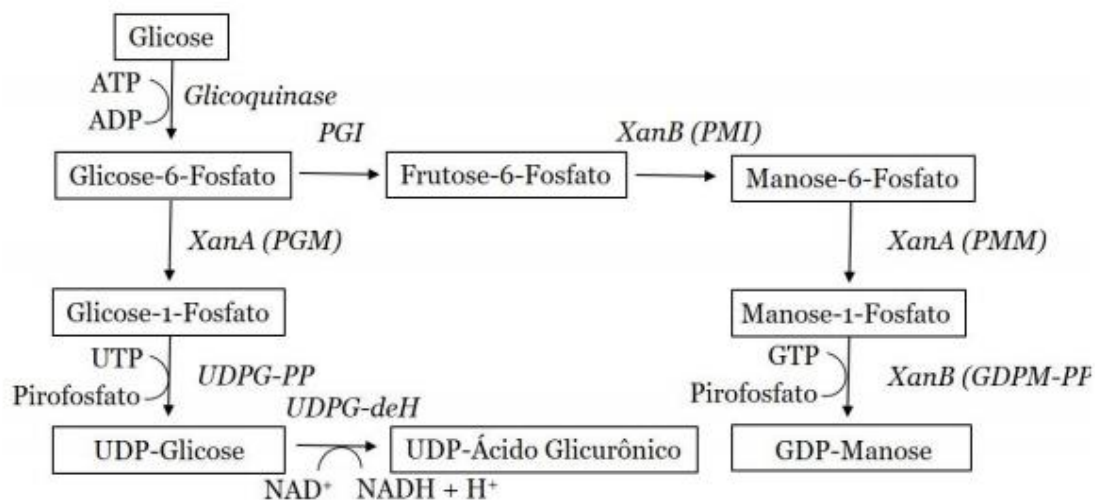


Figura 4. Via de síntese das unidades dos açúcares precursores da goma xantana (Kundlatsch, 2017).

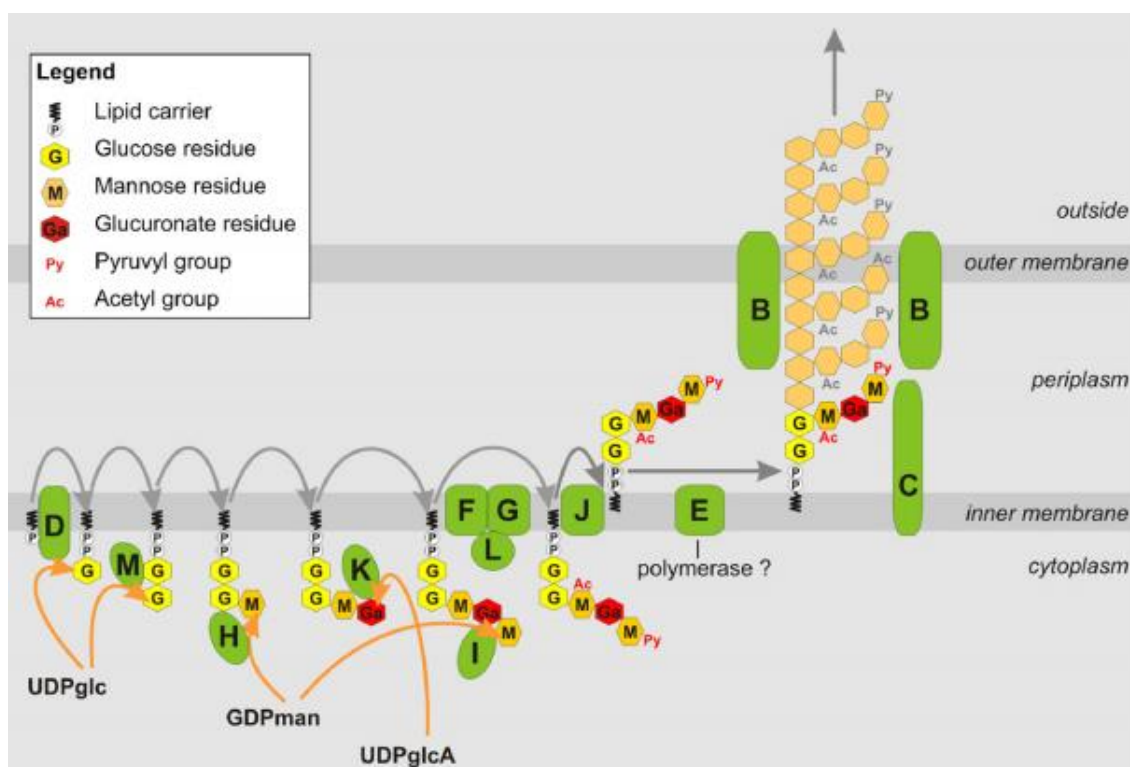


Figura 5. Modelo mecânico da síntese de goma xantana em *Xanthomonas campestris* (Vorhölter et al., 2007).

3.4 Otimização racional do sistema

As ferramentas advindas da Biologia Molecular e técnicas consolidadas para manipulação de espécies do gênero *Xanthomonas* já vieram se consolidando há bastante tempo, com estudos sendo realizados há muitos anos (ARLAT et al., 1991; KAMOUN e KADO, 1990). No entanto, não existem na literatura informações referentes ao desenvolvimento de linhagens otimizadas para produção de goma xantana advindas de um processo racional. O grande foco dos trabalhos já desenvolvidos na área está relacionado a meios de cultura, condições de cultivo e recuperação do composto, com poucos trabalhos em manipulações genéticas voltados para a produção.

O primeiro passo nesse sentido foi dado pelo trabalho de Kundlatsch (2017) com o desenvolvimento de um modelo determinístico modularizado para a identificação das etapas limitantes na via de produção dos monômeros da goma. Embora limitado pela ausência de dados a respeito de mecanismos de regulação, poucos dados sobre a cinética das enzimas da via de síntese dos monômeros e nenhuma informação a respeito das proteínas do operon Gum, o trabalho buscou encontrar os gargalos que se contornados poderiam aumentar a produção da goma xantana. Além disso, o modelo desenvolvido foi planejado de maneira modular, permitindo assim que conforme novas informações sobre proteínas envolvidas na produção da goma forem sendo publicadas, elas possam ser adicionadas ao modelo para permitir novas previsões de gargalos. Então com a implementação desse modelo em Python e a partir da utilização de informações da literatura disponíveis, foi possível sugerir que as etapas realizadas pelas enzimas UDPG-PP e UDPG-deH, responsáveis pelas reações de conversão de glicose-1-fosfato à UDP-glicose e posteriormente à UDP-ácido glucurônico, respectivamente, limitam o fluxo de produção dos monômeros para montagem da goma. Com isso, a construção de linhagens onde não exista tal limitação, ou seja, onde haja um maior fluxo nas reações citadas, consistiu na proposta final do projeto como um todo buscando maiores produções de goma xantana.

3.5 ePathBrick vectors e sequência CAP

Entre as ferramentas disponíveis para expressão de múltiplos genes, o sistema denominado *ePathBrick vectors* (XU et al., 2012) foi escolhido para este trabalho. Esses plasmídeos constituem uma plataforma para montagem de vetores de expressão de vários genes de uma via ou geração combinatória de diversidades de uma via. Utilizando o conceito de BioBricks, os vetores utilizados contêm quatro sítios de restrição compatíveis (*AvrII*, *XbaI*, *SpeI* e *NheI*) alocados em posições estratégicas, de forma que os genes clonados podem ser facilmente organizados na forma de operons, pseudo-operons ou de forma monocistrônica, permitindo a criação de configurações diversas para expressão dos genes/vias de interesse (Figura 6).

Cada um dos cinco plasmídeos ePathBrick apresenta uma origem de replicação diferente, mas todas pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade, permitindo a permanência conjunta de mais de um plasmídeo do conjunto dentro da mesma célula. Esse conjunto de vetores foi originalmente desenvolvido para uso em *E. coli*, especificamente para linhagens capazes de expressar a RNA polimerase T7 (linhagens DE(3)), pois o promotor utilizado para expressão dos genes era o T7. Mas já existem as versões dos plasmídeos onde o promotor T7 foi substituído pelo promotor lacUV5 (SILVA et al., 2021), o que possibilita a ampliação de sua utilização em qualquer linhagem de *E. coli*.

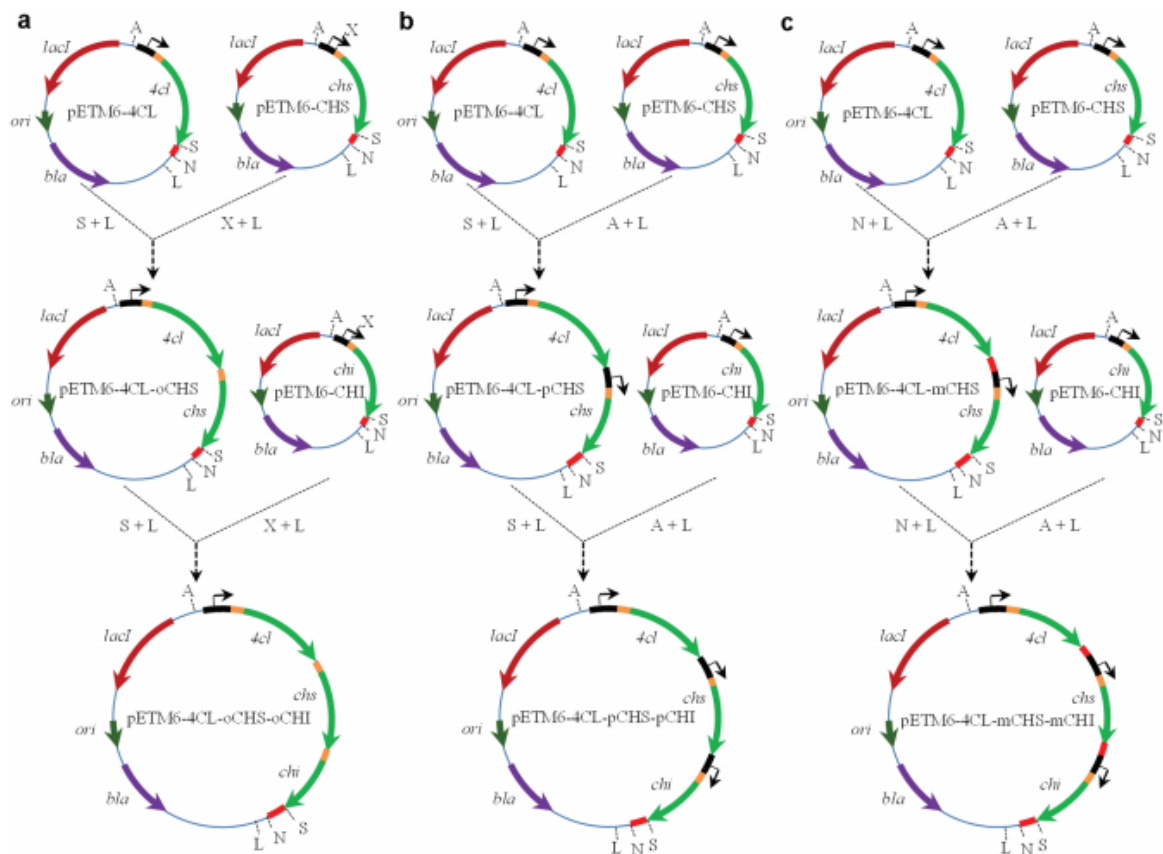


Figura 6. Esquema de montagem das diferentes configurações possíveis para a via de interesse (utilizando 3 genes como exemplo, a partir da combinação de pares específicos de enzimas de restrição). (a) **Operon**: O agrupamento de genes fica sob o controle de um único sinal regulador (um promotor, um terminador). Essa configuração pode ser alcançada digerindo o vetor doador com pares de enzimas de restrição *XbaI* (*X*) / *SmaI* (*L*) e ligando-o ao vetor de destino digerido com *SpeI* (*S*) / *SmaI* (*L*). O local *SpeI* foi retido e pode ser reutilizado para montagem de genes a jusante. (b) **Pseudo-operon**: Os genes ficam todos sob o controle de um único terminador, porém cada gene com seu promotor, criando um gradiente crescente de nível de expressão. Essa configuração pode ser obtida digerindo o vetor doador com pares de enzimas de restrição *AvrII* (*A*) / *SmaI* (*L*) e ligando-o ao vetor de destino digerido com *SpeI* (*S*) / *SmaI* (*L*). (c) **Monocistrônico**: Cada gene possui seu promotor e terminador. Essa configuração pode ser obtida digerindo o vetor doador com as enzimas de restrição *AvrII*(*A*) / *SmaI*(*L*) e o vetor receptor com o par *NheI*(*N*) / *SmaI*(*L*). (XU et al., 2012).

Como relatado por Soby e Daniels (1996), o promotor *lac* mostra-se funcional em *Xanthomonas*, sendo positivamente ativado por uma proteína chamada Clp (Catabolite repressor-like protein). Clp é classificado como um fator de transcrição que controla múltiplos fatores de virulência (TAO et al., 2010), e é descrito também que é reprimido por c-di-GMP. Acontece que esse composto responsável pela repressão, quando em altas concentrações celulares, é hidrolisado como resposta a mecanismo de *quorum sensing* (RYAN et al., 2006). Com isso, Clp não é mais reprimido e resulta em transcrição dos genes de virulência.

Sabe-se que as enzimas da via da goma xantana (operon gum) também são reguladas pela proteína Clp (HE et al., 2007), logo o sistema heterólogo deve permitir que a super-expressão das proteínas UDPG-PP e UDPG-deH aconteça de maneira análoga a naturalmente encontrada nas células. Além disso, o sistema poderá ser reprimido pela proteína LacI codificada nos plasmídeos da coleção, evitando o vazamento da expressão dos genes clonados. Alternativamente, também poderia ser possível promover a indução do sistema de forma independente da proteína Clp, se desejado, pela adição de IPTG ou lactose ao meio de cultivo.

Ainda nesse contexto da proteína Clp, este trabalho buscou o teste de uma sequência consenso de reconhecimento da proteína denominada CAP (*catabolite gene activator protein*) de *Escherichia coli* (EBRIGHT et al., 1989). Essa é uma proteína de ligação específica de sequência de DNA envolvida na regulação de transcrição gênica. Na presença do efetor alostérico AMP cíclico (cAMP), a proteína CAP se complexa com o mesmo e liga-se a sítios de DNA alvo específicos em promotores ou regiões próximas a eles, assim estimulando positivamente a iniciação da transcrição. Como é o caso, por exemplo, do operon *lac* em *E. coli*, no qual esse sistema desempenha a capacidade de regular a transcrição de genes sob controle do promotor *lac* em *E. coli* (EBRIGHT et al., 1989). Trabalhos internos do grupo já demonstraram um alto poder de aumento da expressão dos genes sob o promotor *lac* precedido da sequência de reconhecimento de CAP (dados não publicados) em *E. coli*. Dada essa vantagem do sistema descrito acima, e propriamente pela proteína CAP ser análoga a Clp de *Xanthomonas*, o presente trabalho buscou testar essa sequência de reconhecimento devido sua maior afinidade pelo promotor *lac*, já presente nos plasmídeos de trabalho da coleção de vetores ePathBrick, esperando-

se observar um reconhecimento por Clp e então promover um nível maior de transcrição dos genes controlados por *lac*.

3.6 *Xanthomonas campestris* como principal produtora de goma xantana

Estudos envolvendo a coloração de polissacarídeos mostram que muitos isolados de *Xanthomonas* ssp. apresentam polissacarídeos capsulares frequentemente associados de forma livre às células. Este polissacarídeo capsular é a goma xantana, e *Xanthomonas campestris* é o microrganismo mais comumente empregado e estudado para a produção industrial de xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Glicose e sacarose são os substratos mais utilizados como fontes de carbono na produção comercial de goma xantana, mas dentro do processo de produção comercial da goma o custo do meio de fermentação é visto como uma oportunidade econômica a ser explorada. Por esse motivo, estudos têm se concentrado no uso de resíduos industriais como alternativas naturais de baixo custo para servir de substrato na produção de goma, como por exemplo a polpa de beterraba, águas residuais de moinhos de azeite, resíduos agrícolas, hidrolisados ácidos, amido não modificado, soro de queijo e melaço de cana-de-açúcar. Usar melaço é uma boa alternativa para meios sintéticos, mas seu uso como única fonte de carbono leva a uma fase de latência prolongada no crescimento celular e um aumento de viscosidade (HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, 2017).

Na literatura são relatados diversos estudos acerca da produção de goma xantana por diferentes subespécies de *Xanthomonas campestris*, porém algumas delas são mais eficientes na produção da mesma, como é o caso da linhagem de *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 (KENNEDY e BRADSHAW, 1984), que tem sido amplamente utilizada para fins de produção industrial da goma (JEANES, 1974; SUTHERLAND, 1993). Porém para este trabalho, inicialmente, foi escolhida a linhagem de *Xanthomonas campestris* sub. *campestris*, ATCC 33913, que possui genoma sequenciado e torna mais fácil o desenho de primers específicos, para resgate das sequências dos genes de interesse, e posteriores consultas a regiões do genoma.

4. Material e métodos

4.1 Linhagens bacterianas

4.1.1 *Xanthomonas campestris sub. campestris*

Células de *Xanthomonas campestris sub. campestris* ATCC 33913, foram adquiridas da Fundação André Tosello, e foram utilizadas durante o trabalho para a extração do DNA genômico, buscando o isolamento dos genes de interesse, e também como hospedeiras das construções plasmidiais finais para super-expressão dos mesmos. O cultivo desta bactéria foi feito utilizando o meio de cultura caldo nutriente (CN), e temperatura ótima de crescimento de 28-30°C, como descrito pela plataforma da aquisição da linhagem.

Para alguns testes iniciais a linhagem de *Xanthomonas citri sub. citri* 306 foi utilizada, e esta foi doada pela Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Marques Novo-Mansur, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, e seus parâmetros de cultivo seguiram os mesmo de XCC.

4.1.2 *E. coli* DH5α

Para a clonagem das sequências de interesse foi utilizada a linhagem de *E. coli* DH5α. Para o crescimento bacteriano e para a produção das proteínas em *E. coli* as células foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) contendo antibiótico, temperatura ótima de crescimento a 37°C e agitação de 250 rpm.

4.2 Testes de resistência à antibióticos

Células de *Xanthomonas campestris sub. campestris* foram submetidas a um teste de resistência à antibióticos para auxiliar na escolha do plasmídeo de trabalho, evidenciando possíveis resistências naturais. Para esse teste as bactérias foram distribuídas em diferentes placas, contendo meio CN-Agar junto a diferentes

concentrações de antibióticos (canamicina, streptomicina, cloranfenicol e ampicilina, conforme tabela 1), e posteriormente incubadas por 72 horas a 30°C para observar seu desenvolvimento.

Tabela 1. Concentrações de antibiótico utilizadas para teste de resistência.

Plasmídeo	Antibiótico	Concentração (ug/mL)
pRSM4	Canamicina	50
pACM5	Cloranfenicol	25
pETM7	Ampicilina	80
pCDM5	Streptomicina	50
pCOM5	Canamicina	50

4.3 Desenho de primers e simulações de PCR e clonagem

Os primers para recuperação e *screening* dos genes de interesse foram desenhados com auxílio do software SnapGene, um programa que oferece uma maneira mais rápida e fácil de planejar, visualizar e documentar a clonagem de DNA e PCR, permitindo anotar recursos e fazer o *design* de primers. Durante o desenho dos primers, a partir das sequências dos genes de interesse obtidos no banco de dados do NCBI, sequências de enzimas de restrição foram adicionadas nas extremidades para permitir a futura clonagem dos genes amplificados no plasmídeo de interesse. Alguns parâmetros foram analisados de modo a garantir um melhor desempenho para as reações de amplificação por PCR: a ferramenta OligoAnalyser, disponível no site da Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) foi utilizada para determinar a porcentagem do conteúdo de GC e da temperatura de melting (TM), assim como para verificar a formação de *Self-dimer*, *hetero-dimer* e formação de *hairpins*.

Através do *software* SnapGene foi possível simular reações de PCR com os *primers* desenhados e obter como produtos os genes com os sítios de restrição, confirmando o desenho correto dos primers. Após essa etapa também foi feita a restrição tanto dos genes quanto da sequência do plasmídeo, permitindo uma simulação da reação de ligação entre gene e o plasmídeo escolhido, tornando assim possível prever como seria o produto final (Figura 7 e 8).

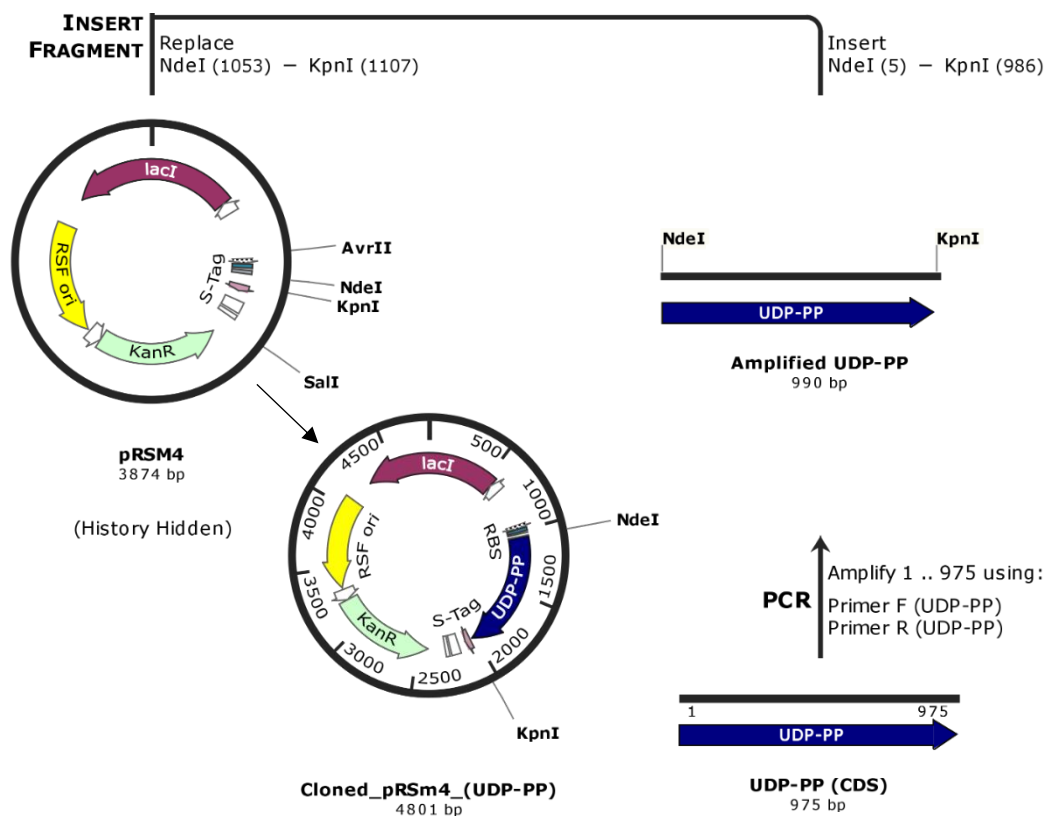


Figura 7. Esquema da clonagem individual do gene para UDPG-PP para montagem do plasmídeo pRSm4_PP

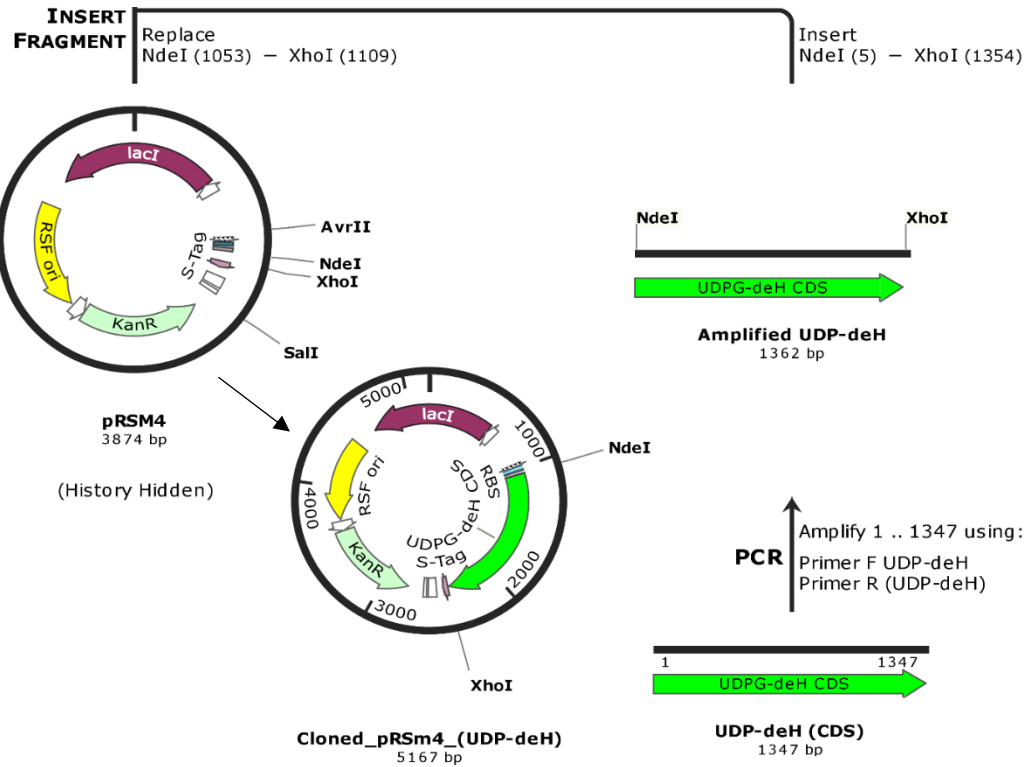


Figura 8: Esquema da clonagem individual do gene para UDPG-deH para montagem do plasmídeo pRSm4_deH.

Para as etapas de *screening* foi desenhado um par de primers “genéricos” para amplificar o múltiplo sítio de clonagem do plasmídeo (MSC), permitindo assim verificar a presença ou não de genes na região do MSC e podendo ser empregados no *screening* de qualquer gene inserido no plasmídeo. Outros primers que se fizeram necessários, como apontado nos resultados, se encontram descritos na tabela de primers (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência de primers utilizados para os diferentes.

Procedimento	Identificação	Sequência (5' – 3')	Enzima de restrição
Recuperação e clonagem dos genes de interesse	Primer F UDPG-deH	CTACATATGCGAGTTGCGATCTTTGG	NdeI
	Primer R UDPG-deH	GA <u>ACTCGAGT</u> CATGCATGCAGCGAACG	XhoI
	Primer F UDPG-PP	CTACATATGAGCAAGCGTATTCGCAAGG	NdeI
	Primer R UDPG-PP	AATGGTACCTCAAGCATGGCACCCTCTTC	KpnI
Screening do MSC	Primer F Screening	GGTGATGTCGGCGATATAGG	-
	Primer R Screening	GAGAGCGTTCACCGACAAAC	-
Screening resistência Canamicina	Primer F Kan	CTCATCGAGCATCAAATGAAACTGC	-
	Primer R Kan	GAGCCATATTCAACGGGAAACGTC	-

4.4 Clonagem das ORFs e construção dos plasmídeos.

Os procedimentos de clonagem foram realizados segundo Sambrook e Russell (2001). Os dois genes de interesse foram amplificados por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA genômico de *X. campestris sub. campestris*, que foi extraído com o kit comercial AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep kit (Axygen), e as condições utilizadas no termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation®) para recuperação deles podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros para PCR

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Descrição
30	95	5 min	Desnaturação
	95	15 seg	Desnaturação
	Tm*	30 seg	Hibridização
	72	1min/kb	Extensão
1	72	5 min	Extensão
1	4	-	Manutenção

*Tm = Temperatura de melting → Neste caso ela é calculada pela média das Tm dos primers Forward e Reverse e é subtraído o valor de 5

As reações eram compostas por 25 µL de Taq High Fidelity Pol Master Mix 2X® (Cellco®), 2,5 µL do mix dos primers (concentração final de 10 pmol/µL de cada primer), e aproximadamente 50 ng de DNA molde. Com isso, X µL de água eram adicionados de maneira a reação final atingir 50,0 µL.

Depois dessa etapa de aumento do número de cópias do DNA, o mesmo foi purificado a partir do recorte da banda de interesse do gel de agarose, utilizando o kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega®). O DNA então foi digerido com enzimas de restrição adequadas, indicadas nos primers de cada gene na tabela 2, e ligado ao plasmídeo pRSM4 da série ePathBrick vectors (extraído de células DH5α com o kit Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system (Promega®)). As reações de ligação foram realizadas utilizando a proporção 3:1, de inserto para vetor, mantendo como padrão a quantidade de 75 ng de vetor, e o cálculo do inserto, que leva em consideração o tamanho de cada molécula de DNA, foi realizado através da calculadora online (NEBioCalculator). A montagem das ligações consistiu em 4 µL de Fast Ligase Buffer (tampão) (Thermo Scientific®), 1 µL da enzima Fast Ligase (Thermo Scientific®), os 75 ng de vetor, X de inserto (resultado da calculadora), e X µL de água até completar 20 µL de reação. Uma vez a reação montada, a mesma era incubada em temperatura ambiente overnight.

A reação de ligação foi utilizada para transformação de células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes pela técnica de choque térmico. Após extração dos plasmídeos das células de *E. coli*, os mesmos foram transferidos para *Xanthomonas* eletrocompetentes pela técnica de eletroporação, conforme descrito no próximo tópico.

Os plasmídeos utilizados e gerados durante o trabalho podem ser consultados na tabela 4 abaixo:

Tabela 4. Plasmídeos utilizados e construídos.

Nome	Gene	Resistencia	Referência
pRSM4	-	Canamicina	Silva et al., 2021
pETM7	-	Ampicilina	Silva et al., 2021
pCOM5	-	Canamicina	Silva et al., 2021
pACM5	-	Cloranfenicol	Silva et al., 2021
pCDM5	-	Streptomicina	Silva et al., 2021
pRSM4_mc	m_cherry	Canamicina	LaFaC
pRSM5	CAP	Canamicina	Este trabalho
pRSM4_deH	UDPG-deH	Canamicina	Este trabalho
pRSM4_PP	UDPG-PP	Canamicina	Este trabalho
pRSM5_mc	m_cherry	Canamicina	Este trabalho
pRSM5_PP	UDPG-PP	Canamicina	Este trabalho
pRSM5_deH	UDPG-deH	Canamicina	Este trabalho

4.5 Técnicas de transformação e preparo de células competentes

Preparação de células eletrocompetentes de XCC e eletroporação

Linhagens de *Xanthomonas sp.* foram transformadas pela técnica de eletroporação, que consiste na utilização de células eletro-competentes para internalização da construção de DNA através de pulso elétrico, seguindo o protocolo descrito por Wang et. al. (2016). O preparo dessas células competentes consistiu em primeiramente realizar o cultivo da *Xanthomonas* em 100 mL de LB, em Erlenmeyers de 1L, até que a DO (600 nm) atingisse 0,25, seguindo-se para uma centrifugação a 4000xG a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 25 mL de água deionizada estéril gelada. Em seguida, uma nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores foi realizada, e o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido dessa vez em 12,5 mL da água deionizada estéril gelada. Duas novas centrifugações foram realizadas, ainda nos mesmos parâmetros

e com o sobrenadante sendo descartado, sendo que o primeiro pellet foi ressuspenso em 10mL glicerol 10% gelado e estéril e o segundo em 1 mL do glicerol 10% gelado. Uma última etapa de centrifugação foi realizada com a ressuspenção final em 0,5 mL da solução 10% de glicerol, seguindo-se para alíquotagem de 40 uL em *eppendorfs* de 1,5 mL e estoque em ultrafreezer a -80°C até momento de uso.

O procedimento da eletroporação foi conduzido com 1 *eppendorf* de células competentes preparadas anteriormente, descongeladas em gelo, e misturadas com 100 a 200 ng de DNA, não ultrapassando o limite de 10% do volume de células competentes. A eletroporação foi então conduzida em cubetas de 0,1 cm de gap, e mantidas em gelo até o momento da descarga elétrica utilizando o eletroporador BIO-RAD Gene-Pulser Xcell™. O pulso foi configurado para 15 KV/cm, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω e então realizado com menos de 1 minuto após a mistura das células competentes com os plasmídeos. Após o pulso, imediatamente foi adicionado 1 mL de meio LB gelado na cubeta, realizando-se gentilmente a homogeneização de todo conteúdo, que foi posteriormente transferido para um *eppendorf* de 1,5 mL estéril, e foram então incubadas a 28°C em agitador a 200 rpm por 2 horas. A última etapa consistiu no plaqueamento de uma alíquota dessas células, geralmente 100 µL, em placas de meio CN-Agar com o devido agente seletivo.

4.6 Etapas de Screening

As etapas de *screening*, para confirmação da internalização do plasmídeo pelas bactérias, utilizadas durante esse trabalho podem ser divididas três.

A primeira delas foi a utilização do próprio marcador de seleção de resistência a antibiótico presente nos plasmídeos (Tabela 1), no qual o crescimento da bactéria no meio seletivo para o mesmo, indica a presença do dado plasmídeo. Porém somente esta etapa de *screening* pode oferecer resultados falso positivos quando se está analisando a clonagem de um gene de interesse dentro do plasmídeo, pois pode ter ocorrido recircularização sem a inserção do gene.

Para isso uma segunda etapa de *screening*, a de PCR de colônia, foi empregada, utilizando dos primers descritos na tabela 2, sendo possível verificar a presença do

plasmídeo e do gene de interesse através da amplificação dos mesmos, pela técnica de PCR, e verificação em gel de agarose através de eletroforese.

A terceira etapa de *screening* foi através da restrição, em que após extração plasmidial, com as devidas enzimas de restrição, verifica-se o tamanho das bandas apresentadas no gel de agarose durante o processo de eletroforese e analisa-se se as mesmas estão dos tamanhos esperados.

5 Resultados e discussão

5.1 Testes iniciais e escolha do plasmídeo

Antes da aquisição da linhagem de XCC, testes iniciais foram realizados em XAC, doadas pela Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com o propósito de fornecer um panorama geral do gênero *Xanthomonas* em relação a resistências naturais de antibióticos e comportamento perante eletroporação dos plasmídeos da coleção dos ePathBrick vectors. Para XAC, dentre os antibióticos testados (canamicina, streptomicina, cloranfenicol e ampicilina), foi observada resistência natural somente para ampicilina, excluindo o pETM5 dos testes para eletroporação. Em cultivo após as eletroporações com os outros plasmídeos da coleção, colônias foram observadas para os plasmídeos pRSM4, pCDM5 e pCOM5, e não foram observadas colônias para pACM5, todos cultivados em meios de cultura com seus respectivos marcadores de seleção. Através de PCR de colônia e de culturas líquidas, utilizando os primers *Screening_F* e *Screening_R* (Tabela 2), foi observada a presença dos plasmídeos em algumas das colônias bacterianas (Figura 9), na qual esperava-se uma banda de aproximadamente 480 pb para os plasmídeos vazios, e banda de 1119 pb para o pRSM4_mc, que carrega o gene da proteína fluorescente m_cherry. As reações de PCR que utilizaram de culturas líquidas não acusaram a presença do plasmídeo mesmo apresentando crescimento em meio com antibiótico seletivo, e o mesmo ocorreu para algumas colônias advindas da placa de meio sólido (poços 5, 6 e 8 da figura 9).

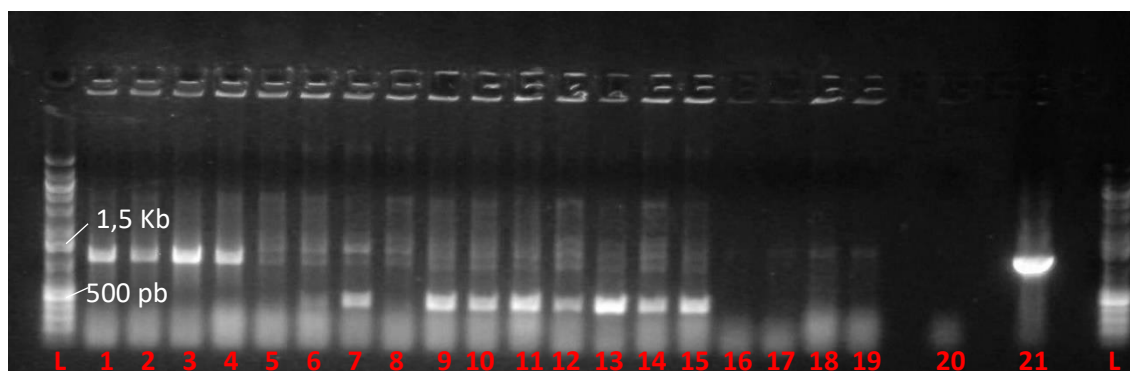


Figura 9. Gel de agarose resultante da reação de PCR do teste de eletroporação em XAC. De 1-15 foram utilizadas colônias de placas com meio sólido como molde, sendo de 1-4 pRSM4_mc; 5-8 pCOM5; 9-12 pRSM4; 13-15 PCDM5; de 16-19 foram utilizadas bactérias em meio líquido cultivadas overnight como molde, sendo 16 – pRSM4, 17 - pCDM5, 18 – pCOM5 e 19 – pRSM4_mc; 20 controle negativo; 21 controle positivo com pRSM4_mc ; L é o padrão de tamanho molecular.

Após aquisição da linhagem de XCC os mesmos testes foram realizados e com isso também foi observada resistência natural a ampicilina, excluindo o plasmídeo pETM5 como escolha de vetor de trabalho. Logo, os outros quatro plasmídeos foram eletroporados em XCC e observou-se poucas colônias após incubação, mas presentes para todos os plasmídeos, e ainda em comparação com a XAC houveram colônias na placa para o plasmídeo pACM5.

Em seguida, foi realizada PCR de colônias com os mesmos primers anteriores, esperando o mesmo padrão de bandas, 480 pb para os plasmídeos vazios e 1119 pb para o pRSM4_mc, e os resultados obtidos estão na figura 10. A mesma situação curiosa observada em XAC ocorreu para XCC, no que se diz a respeito de haverem colônias que cresceram no antibiótico e no teste de PCR não ser observada nenhuma banda esperada, adicionando-se ainda o aparecimento de bandas inespecíficas nas amostras 4,5,12,13,14 e 15 (circuladas em vermelho na figura 10) que não correspondem a nenhuma amplificação esperada, e que não estão presentes nos padrões positivos. Entretanto, as bandas mais baixas das mesmas amostras correspondem ao tamanho esperado de 480 pb para os plasmídeos vazios.

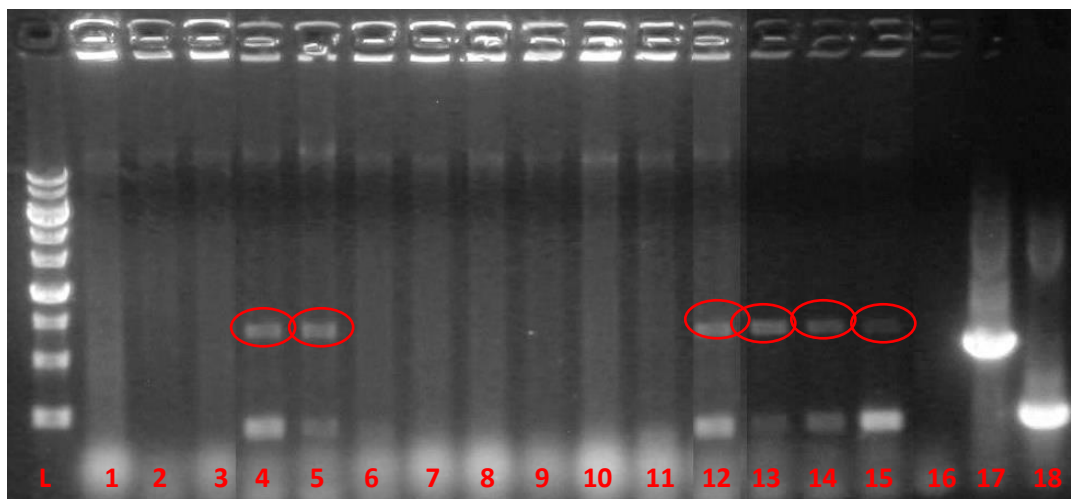


Figura 10. Gel de agarose resultante da reação de PCR do teste de eletroporação em XCC utilizando colônias como molde. 1-3 pRSM4_mc, 4-6 pCDM5, 7-9 pCOM5, 10-12 pRSM4, 13-15 pACM5, 16 controle negativo, 17 controle positivo com pRSM4_mc, 18 controle positivo com pRSM4, L é o padrão de peso molecular.

Apesar de a coleção de plasmídeos ter sido desenvolvida inicialmente para *E. coli*, os resultados dos testes de eletroporação demonstrados sugeriram uma possível funcionalidade dos mesmos em *Xanthomonas*, já que foi observado o crescimento de colônias nos meios seletivos com antibióticos e foi possível amplificar as bandas de tamanho esperado nos testes de PCR de colônia. Dessa forma, os plasmídeos pCDM5, pRSM4 e pACM5 se mostraram como opção de vetores de trabalho. Com isso, o plasmídeo pRSM4 foi escolhido para dar continuidade, primeiro por apresentar marcador de antibiótico de não resistência natural em XCC e também por possuir um alto número de cópias em comparação aos demais.

5.2 Amplificação dos genes de interesse

Após a extração genômica de XCC, foi realizada uma reação de PCR para amplificação dos genes de interesse UDPG-PP e UDPG-deH, utilizando os respectivos pares de primers para cada gene (Tabela 2), desenhados a partir do genoma sequenciado da linhagem de XCC, obtido no banco de dados NCBI. A reação foi aplicada em gel de agarose e o resultado pode ser observado na figura 11,

evidenciando as bandas que correspondem com o tamanho esperado dos genes de 975 pb para UDPG-PP e 1347 pb para UDPG-deH. Por sua vez as bandas contendo os genes foram recortadas do gel e o procedimento de purificação foi realizado. Salienta-se que, nas extremidades dos primers para recuperação dos genes, foram inseridas as sequências de enzimas de restrição compatíveis com os plasmídeos ePathBrick.

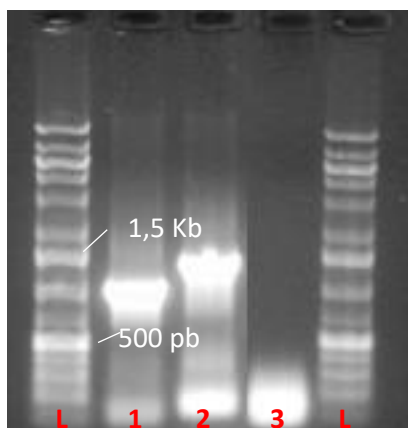


Figura 11. Gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos de PCR a partir de DNA genômico de XCC para obtenção dos genes de interesse UDPG-PP e UDPG-deH. 1 - UDPG-PP; 2 - UDPG-deH; 3 - controle negativo; L é o padrão peso molecular

5.3 Montagem dos plasmídeos

Os plasmídeos pRSM4_PP e pRSM4_deH foram montados carregando respectivamente os genes para as enzimas UDPG-PP e UDPG-deH. Para isso os genes purificados da reação de PCR do DNA genômico de XCC foram digeridos, assim como o pRSM4, cada um com sua respectiva combinação de enzimas, *NdeI/KpnI* para UDPG-PP e *NdeI/XhoI* para UDPG-PP (Figura 12). Posteriormente à reação de ligação, os novos plasmídeos construídos foram transformados em *E. coli* DH5a e reações de PCR de colônia foram conduzidas para confirmação das novas montagens. O resultado positivo pode ser observado nas imagens 13 e 14. O resultado positivo para pRSM4_deH não pode ser confirmado pelo aparecimento de bandas inespecíficas na figura 13, e então o processo de PCR foi realizado novamente e o resultado positivo foi confirmado na figura 14.

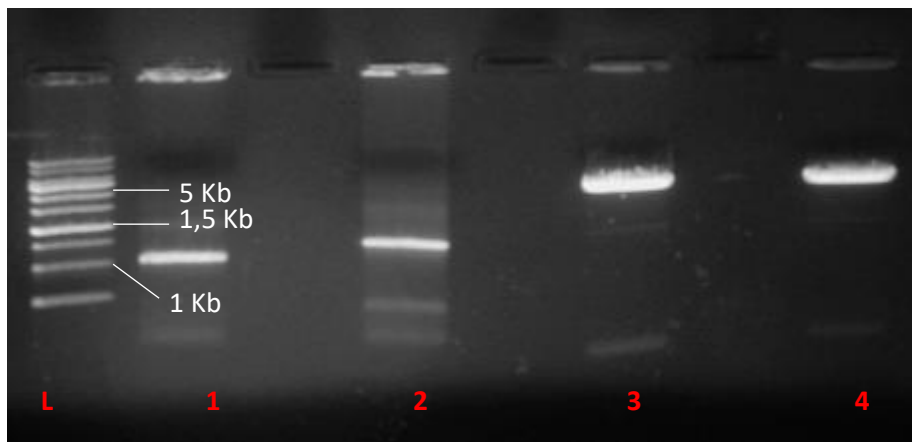


Figura 12. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de digestão para posterior montagem dos plasmídeos de interesse. 1 – UDPG-PP (NdeI/KpnI); 2 – UDPG-deH (NdeI/XhoI); 3 – pRSM4 (NdeI/XhoI); 4 – pRSM4 (NdeI/KpnI).

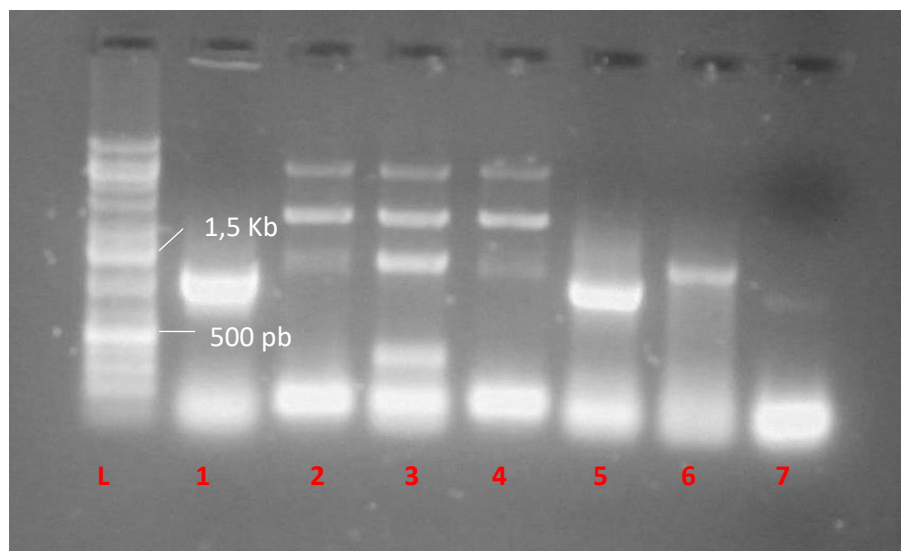


Figura 13. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de PCR de colônia. 1- pRSM4_PP, 2-3-4 pRSM4_deH, 5 - positivo UDPG-PP, 6 – positivo UDPG-deH, 7 – controle negativo, L – padrão de peso molecular.

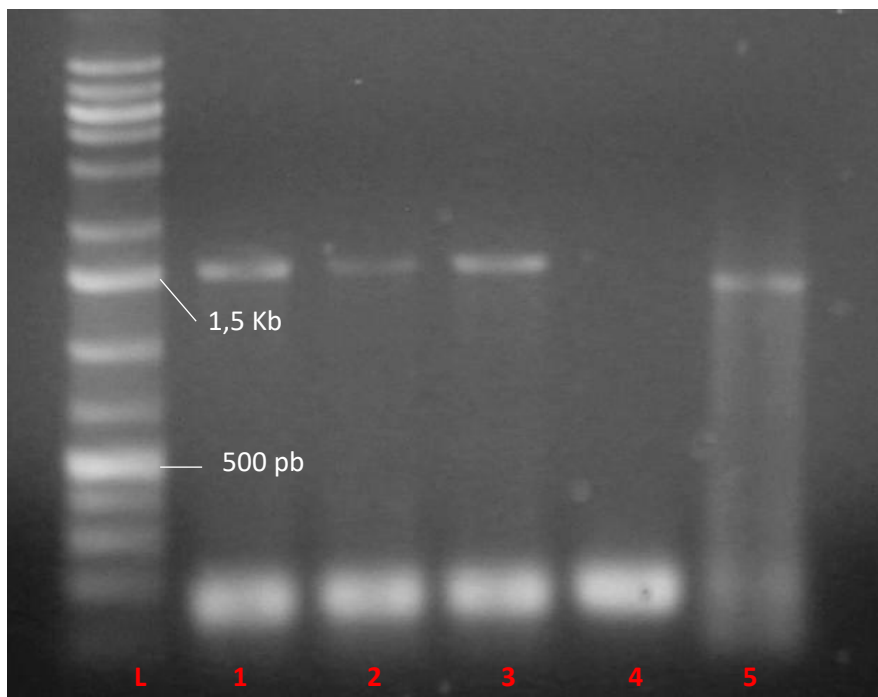


Figura 14. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de PCR de colônia. 1-3 pRSM4_deH, 4 – controle negativo, 5 – positivo UDPG-deH, L – padrão de peso molecular.

Para testes com a sequência CAP, o plasmídeo pRSM5 foi montado. Para isso, a sequência de interesse foi retirada do plasmídeo pETM8 (Interno/grupo) com o uso das enzimas de restrição *SacI*/*AvrI*, e ligada ao plasmídeo pRSM4 entre os mesmos sítios de restrição, como esquematizado na figura 15. Para confirmar a montagem do plasmídeo pRSM5, contendo a região da sequência CAP, foi feita uma reação de PCR em que um dos primers utilizados se hibridiza exatamente sobre a sequência CAP. Uma banda de aproximadamente 1800 pb era esperada para confirmação da correta montagem do pRSM5, como pode ser observado na figura 16.

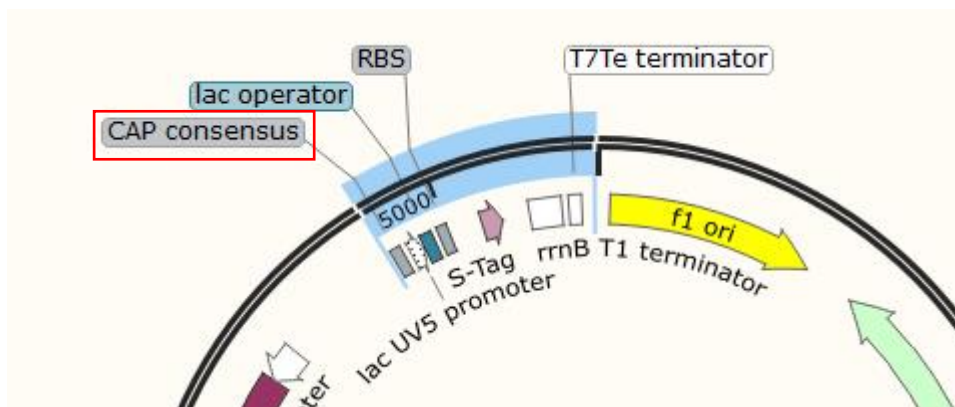


Figura 15. Recorte do esquema do plasmídeo pETM8, no qual a parte azul selecionada representa a região selecionada para clonagem da sequência CAP no pRSM4.

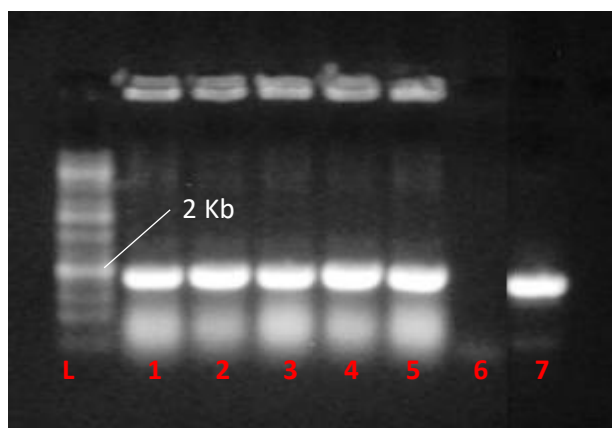


Figura 16. Gel de agarose resultante da eletroforese das reações de PCR de colônia para construção do plasmídeo pRSM5. 1-5 pRSM5, 6 – controle negativo, 7 - controle positivo com pETM8, L – padrão de peso molecular.

Anteriormente já havia sido realizada a montagem do plasmídeo pRSM4_mc carregando um gene repórter, fluorescente na cor rosa, denominado mCherry, posteriormente utilizado em outro trabalho do grupo para avaliação e quantificação da expressão de genes nesse plasmídeo. O gene mCherry foi retirado de um plasmídeo do repositório interno do grupo através de digestão, e sua clonagem foi realizada no pRSM4.

Assim como no pRSM4, os genes de interesse também foram clonados no pRSM5, obtendo-se assim os novos plasmídeos pRSM5_mc, pRSM5_PP e pRSM5_deH. A confirmação das construções foi feita por PCR de colônias, utilizando os primers para amplificação do múltiplo sítio de clonagem do plasmídeo para o pRSM5_mc, e os primers específicos para cada gene no caso de pRSM5_PP e pRSM5_deH. O resultado do eletroforese em gel de agarose pode ser observado na figura 17.

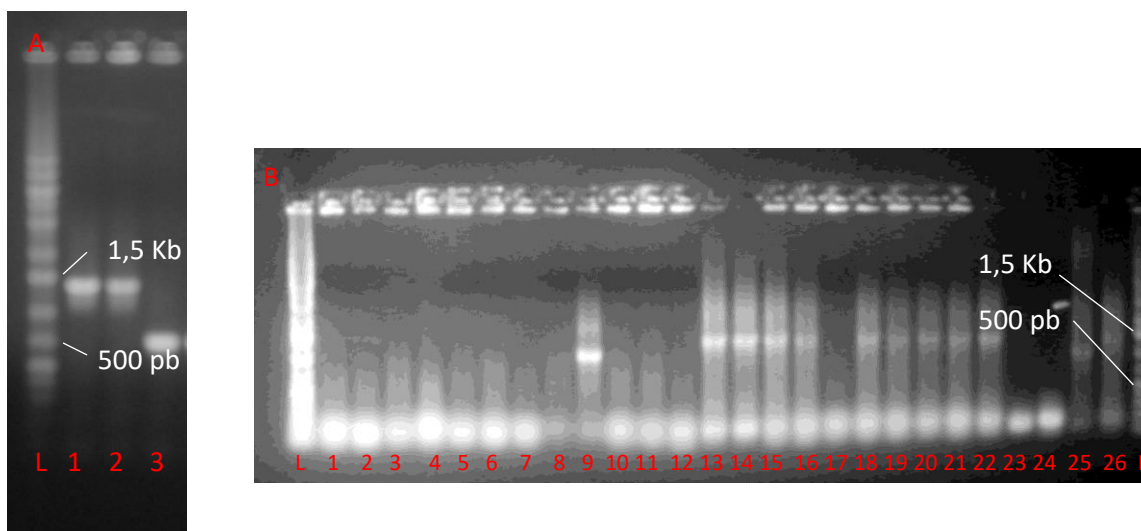


Figura 17. Géis de agarose resultantes da eletroforese das reações de PCR de colônia para confirmação da montagem dos plasmídeos pRSM5_mc, pRSM5_PP e pRSM5_deH. (A) 1 – pRSM5_mc, 2 – controle positivo pRSM4_mc, 3 – controle negativo com pRSM4, L – padrão de peso molecular. (B) 1-11 pRSM5_PP, 12-22 pRSM5_deH, 23 – controle negativo PP, 24 – controle negativo deH, 25 – controle positivo PP, 26 - controle positivo deH, L – padrão de peso molecular.

5.4 Eletroporação e screening

Uma vez que todos os plasmídeos de interesse haviam sido construídos em *E. coli* DH5alfa, a próxima etapa foi a tentativa de inserção dos mesmos em XCC, pela técnica de eletroporação, e os plasmídeos eletroporados foram o pRSM4, pRSM4_mc, pRSM4_PP, pRSM4_deH, pRSM5, pRSM5_mc, pRSM5_PP, pRSM5_deH. Os resultados de plaqueamento após a eletroporação e posterior incubação foram inicialmente promissores para todos os casos, observando-se o

aparecimento de colônias nas placas com a presença do antibiótico Canamicina, marcador dos plasmídeos da linha pRSM.

Seguiu-se para uma confirmação por PCR de colônia, que utilizou-se de um par de primers diferentes dos utilizados para amplificação inicial dos genes na etapa de clonagem para evitar falsos positivos, ou seja, amplificação dos genes a partir do genoma. Dessa forma, o par de primers de *screening* (Tabela 2) foi utilizado, pois se ancoram de maneira a amplificar o múltiplo sítio de clonagem (MSC) dos plasmídeos utilizados, resultando em uma banda de 456 pb em casos de não conter nenhum gene no MSC, e uma banda de 456 pb + o tamanho do gene clonado, em casos positivos. Contudo, todos os resultados foram negativos, pois os géis de eletroforese não apresentavam a banda esperada em nenhum dos casos, mesmo com repetições do procedimento de PCR e posterior gel da reação. No entanto, esse resultado despertou a curiosidade pelo fato da aquisição de resistência ao antibiótico pela bactéria, pois nem mesmo a banda de plasmídeo sem inserto (456 pb) foi observada.

Como primeira etapa de investigação das XCC resistentes ao antibiótico mas negativas na PCR de colônia, foi realizada a extração plasmidial dessas bactérias e uma pequena quantidade (~40 ng/ μ L) de material genético foi recuperada. Porém ao utilizar esse material como molde para PCR com os primers para o MSC, os resultados continuaram sendo negativos. Esse material foi diretamente aplicado no gel de agarose para verificar o tamanho do mesmo, e nenhuma banda nítida foi observada, descartando a possibilidade de ser o plasmídeo tanto vazio, quanto com qualquer um dos genes inseridos.

Um novo protocolo de preparo de células de XCC eletrocompetentes (Wang et. al, 2016), baseado em soluções de glicose para as etapas de lavagens, foi aplicado para tentar alcançar resultados diferentes, porém o mesmo comportamento anterior foi observado.

No início dos resultados, no tópico de testes iniciais, foram apresentadas PCRs de colônias, tanto de XAC quanto de XCC, que mostravam bandas no gel de agarose que evidenciavam a presença de plasmídeos. E então, retornando a estas linhagens que estavam estocadas a -80°C , e refazendo os testes, agora as mesmas apresentaram os problemas descritos aqui: o crescimento no antibiótico de seleção era observado, mas buscas pela presença do plasmídeo resultavam negativamente,

tanto através de PCRs, quanto através de extração plasmidial, demonstrando alta instabilidade dos plasmídeos nas células de *Xanthomonas*.

Para investigar a aquisição de resistência das células à Canamicina, foi feito o desenho de novos primers para amplificar uma região interna do gene do plasmídeo responsável pela resistência a Canamicina (Tabela 2) para investigar se a resistência ao antibiótico seria proveniente do gene contido no plasmídeo. Após reação de PCR de colônia das XCC resistentes e posterior corrida em gel de agarose (Figura 18), foi observada a amplificação esperada de 805 pb, mostrando a possível origem da resistência a Canamicina, embora não tenha sido possível confirmar a presença do plasmídeo, como discutido anteriormente. Por isso, foi levantada a hipótese de que uma recombinação pudesse estar integrando esse gene de resistência ao antibiótico no genoma das células, explicando seu fenótipo de resistência à Canamicina mesmo não carregando o plasmídeo. Para embasar a hipótese da recombinação, um alinhamento pela ferramenta BLAST do NCBI foi realizado entre a sequência genômica da linhagem de XCC e o plasmídeo pRSM4 vazio para verificar se havia alguma região de similaridade entre as sequências que pudesse ser empregada pela maquinaria celular para promover o evento de recombinação. No entanto, o resultado retornado pela ferramenta dizia que nenhum alinhamento relevante havia sido encontrado (Figura 19), descartando, a princípio, a possibilidade de ocorrência de uma recombinação homóloga. Para o caso dos plasmídeos que continham os genes que a XCC já carrega, poderia haver essa possibilidade de recombinação, mas essa hipótese não podia explicar a aquisição de resistência pelas células transformadas com os plasmídeos vazios (pRSM4 e pRSM5). Dessa forma, a possibilidade de uma recombinação não homóloga (NHEJ) (Figura 20) foi levantada, pois a linhagem utilizada não possui deleção de genes de recombinases.

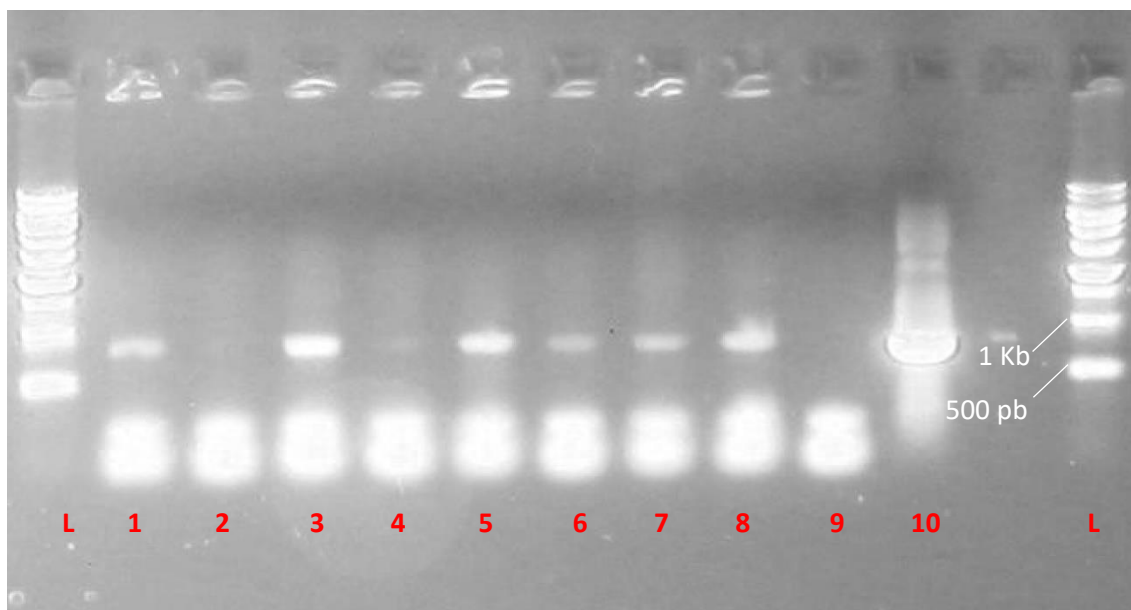


Figura 18. Gel de agarose resultado da eletroforese das reações de PCR de colônias de XCC resistentes a Canamicina. 1-8 colônias de XCC resistentes a Canamicina, 9 - controle negativo, 10 – controle positivo com pRSM4, L - padrão de peso molecular.

Job Title	gb AE008922.1	Filter Results	
RID	A5NDESEFG114 Search expires on 05-19 04:44 am Download All ▾	Percent Identity	<input type="text"/> to <input type="text"/>
Program	Blast 2 sequence <input type="text" value="BLAST search request ID"/>	E value	<input type="text"/> to <input type="text"/>
Query ID	AE008922.1 (nucleic acid)	Query Coverage	<input type="text"/> to <input type="text"/>
Query Descr	Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913 ...	<input type="button" value="Filter"/> <input type="button" value="Reset"/>	
Query Length	5076188		
Subject ID	Ic Query_27161 (dna)		
Subject Descr	None		
Subject	3874		
Length			

⚠ No significant similarity found. For reasons why [click here](#)

Figura 19. Resultado obtido após teste de alinhamento da sequência do genoma de *Xanthomonas campestris sub. campestris* ATCC 33913 com a sequência do plasmídeo pRSM4.

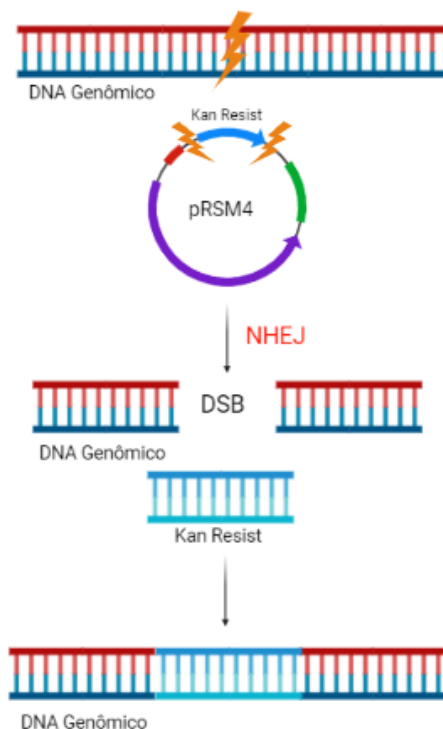


Figura 20. Esquema de uma inserção de gene pelo mecanismo de non homologous end joining (NHEJ).

Para investigar a questão da instabilidade aparente das construções baseadas nos plasmídeos pRSM, foram realizadas eletroporações dos outros plasmídeos do grupo dos ePathBrick vazios, buscando algum cuja permanência na célula pudesse ser confirmada, tendo em vista que as diferenças entre eles são as diferentes origens de replicação e diferentes marcadores de resistência a antibióticos. Infelizmente o mesmo comportamento foi observado para todos os plasmídeos testados: poucas colônias na placa, em torno de 4-5, mesmo plaqueando todo conteúdo de células após eletroporação, concentradas por centrifugação. Estas colônias mostravam-se resistentes ao antibiótico marcador, mas apresentavam resultados negativos nas reações de PCR de colônia com primers para amplificação do MCS.

Embora todos os plasmídeos da coleção possuam diferentes origens de replicação, o fato de todos não terem se mostrado funcionais em *Xanthomonas* pode ser devido a eles pertencerem ao mesmo grupo de compatibilidade (XU, et al. 2012). Isso significa que todos eles são compatíveis uns com os outros e podem coexistir

dentro da mesma célula, o que os aproxima na característica de espectros de hospedeiros, não contradizendo o não funcionamento de todos eles em um dado hospedeiro. E o não funcionamento de uma origem de replicação pode estar atrelado aos mecanismos de replicação e partição que ela pode conferir, pois o espectro de hospedeiros de um plasmídeo, conferido pela sua ori, se relaciona se há ou não, uma compatibilidade entre as enzimas necessárias para o plasmídeo e as presentes no hospedeiro para todo o processo de manutenção, desde a enzima necessária para clivagem da ori, quando necessária, replicação do plasmídeo, até as do sistema de particionamento, que garantem que as células filhas terão o plasmídeo (SNYDER et al., 2013). Snyder traz como exemplo a ori ColE1, ori de plasmídeos como o pETM7, que fazem parte dos ePathbrick, mas que não foi testado em *Xanthomonas* pela resistência natural ao antibiótico marcador. Porém essa ori é relatada como de estreito espectro de hospedeiros, sendo funcional somente em *E. coli* e algumas outras espécies de bactérias intimamente relacionadas, como *Salmonella* e *Klebsiella*.

6. Proposta de construção de plasmídeos para uso em XCC

Como proposta alternativa aos vetores do grupo dos ePathBrick, que neste presente trabalho não se mostraram funcionais em *Xanthomonas*, a montagem de um novo plasmídeo foi planejada utilizando parte do esqueleto dos ePathBrick, buscando manter-se toda a flexibilidade e vantagens que eles trazem, como as possibilidades de montagens dinâmicas de rotas metabólicas, mas combinada a uma nova origem de replicação.

Assim, essa proposta consiste em trocar a região da ori original de algum plasmídeo da coleção, como o pRSM4, por alguma origem de replicação funcional já descrita para *Xanthomonas*. Para isso, foi realizada uma revisão na literatura, mas um número muito reduzido de trabalhos foi encontrado relatando o uso e funcionalidade de algum plasmídeo em células do gênero *Xanthomonas*. Entre os resultados da busca, verificou-se que a Sa ori foi utilizada em trabalhos com *Xanthomonas*, como o

de Amaral et al. (2005), no plasmídeo pUFR047, evidenciado replicativo na bactéria pelos autores, e DeFeyter et al. (1990) que montou anteriormente o plasmídeo pUFR027 para ser utilizado como um vetor de expressão estável em *Xanthomonas campestris sub. malvacearum*. Além da Sa ori, duas outras sequências, a parA, que é responsável pelo sistema de partição do plasmídeo pTAR de *Agrobacterium*, e a repA, que codifica uma replicase e foi descrita por descrita por Tait et al. (1983), seriam também adicionadas ao plasmídeo proposto.

A sequência parA foi utilizada por DeFeyter et al. (1990) na construção de seu plasmídeo pUFR027, e testada com sucesso em *Xanthomonas campestris*, aumentando a estabilidade do plasmídeo, e também utilizada posteriormente na construção do pUFR047 pelo mesmo autor em 1993. De maneira geral, essa sequência deve garantir que todas as células filhas recebam cópias do plasmídeo. Anos mais tarde, Kalnin et al. (2000) realizaram estudos com a região da mesma sequência de parA que DeFeyter descreveu, do plasmídeo pTAR, e descobriu que dentro da sequência de parA existe um códon de início para uma segunda proteína e que se estende até a região *downstream* do gene parA, que o autor chamou de parB. Com seus experimentos, foi possível evidenciar o papel chave do gene parB no funcionamento de parA. Logo, a sequência escolhida para ser inserida no novo plasmídeo é a que contempla os dois genes, e foi denominada parAB.

Já a sequência adicionada para a enzima repA, uma replicase, deve garantir a replicação do plasmídeo, tendo sido descrita por Tait et al. 1983 como fundamental para o bom funcionamento da ori pSa. Em seu trabalho, estes autores realizaram estudos com plasmídeos com mutações deletérias no gene para esta enzima, e mostraram uma baixa atividade replicativa, enquanto o plasmídeo com a sequência íntegra mostrou alta capacidade de replicação.

Com as grandes possibilidades que a biologia sintética trouxe para a ciência, todas essas novas sequências podem dar origem a novos blocos funcionais de DNA, e serem integradas aos *ePathbricks vectors*. Essas sequências podem ser sintetizadas de maneira a serem facilmente colocadas no lugar da presente ori do plasmídeo por uma escolha apropriada de combinação de enzimas de restrição. Um esboço de como seria essa nova construção, demonstrando as enzimas escolhidas a partir das reais sequências citadas para criação desses novos insertos, pode ser

observado na Figura 22, 23 e na Tabela 5 abaixo, e na seguinte descrição do processo.

O primeiro passo seria a montagem de toda a região que substituiria a ori RSF1030 do pRSM4 pela nova região que conteria a ori pSa, o gene para enzima repA, e a região de parAB. Isso pode ser feito pela utilização das enzimas de restrição BssSal e PciI, que excisariam parte da ori do plasmídeo (Figura 21), deixando a sequência da mesma incompleta. Toda essa nova região seria então sintetizada com as mesmas enzimas em suas extremidades, e através da reação de ligação, depois da digestão dos fragmentos pelas enzimas, seria possível a troca

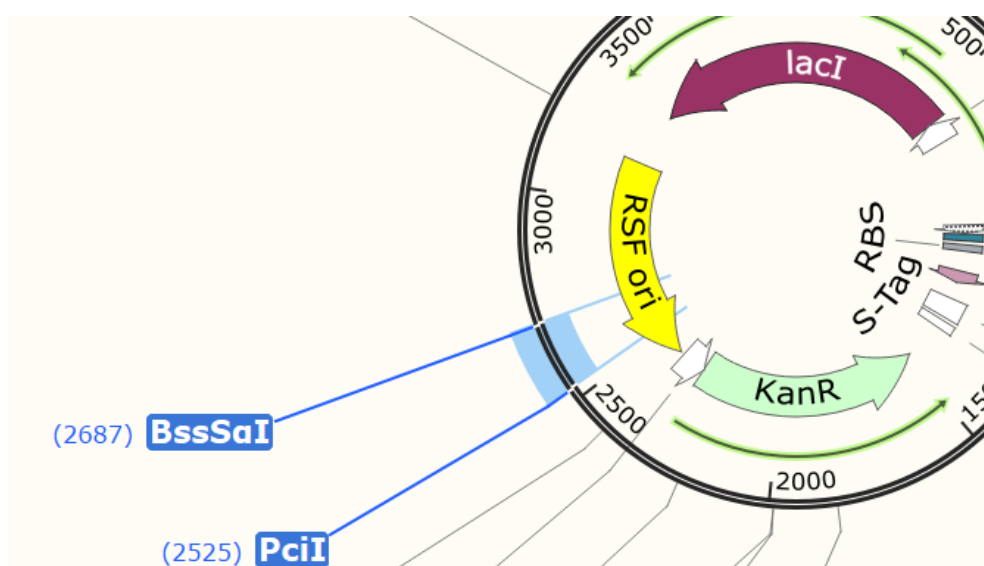


Figura 21. Recorte do esquema do plasmídeo pRSM4 destacando as enzimas de restrição BssSal e PciI escolhidas para realizar a inserção do novo fragmento de DNA.

Afim de facilitar futuras manipulações que se façam necessárias nessa nova região inserida (Figura 22), entre cada sequência nova seria inserida uma enzima de restrição de corte único, em todo o novo plasmídeo, para assim criar blocos que possam ser manipulados a qualquer momento pela combinação das enzimas (Tabela 5). Com essa adição ocorrendo nas extremidades da ori pSa, seriam criados esses blocos que permitiriam o manejo individual de cada sequência, ressaltando que nos casos da região de parAB e RepA, eles seriam tratados como bloco junto a seus promotores, terminadores e RBS.

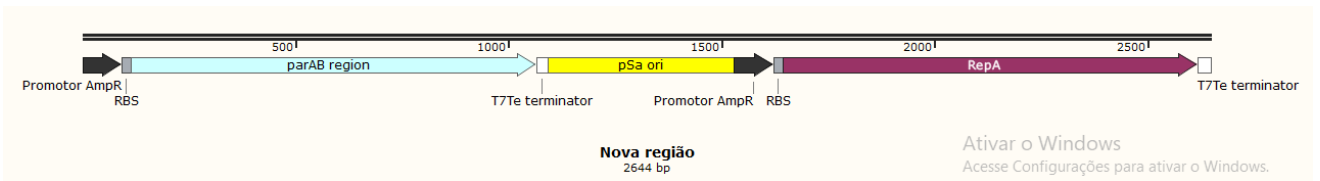


Figura 22. Esquema da nova região contendo a nova ori pSa e os genes para RepA e ParAB.

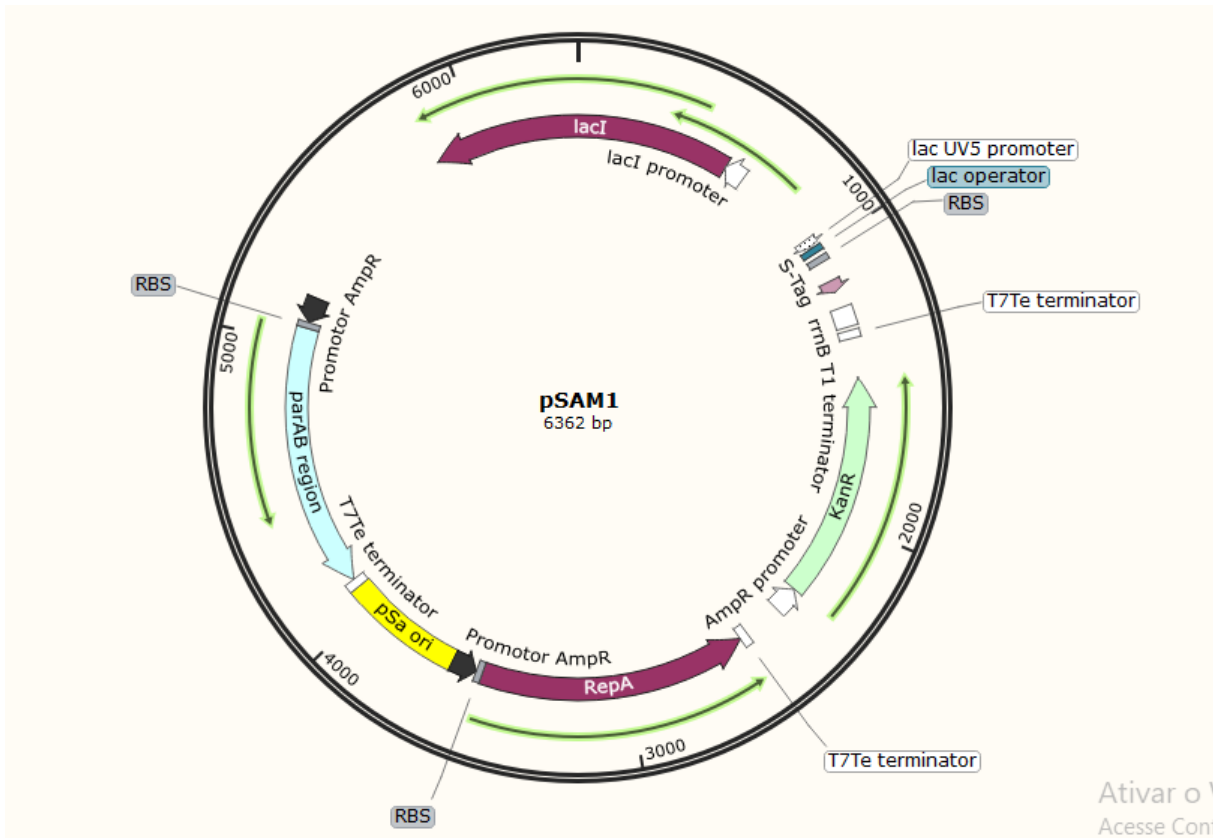


Figura 23. Esquema do plasmídeo proposto pSAM1.

Tabela 5. Insetos propostos com suas respectivas enzimas de restrição para manipulação.

Insetos	Enzimas de restrição		Descrição
ori_pSa	DraI	EcoRI	Origem de replicação
RepA	EcoRI	PciI	Replicase
parAB	BssSal	DraI	Sistema de particionamento

Alternativamente, o novo plasmídeo com as características desejadas poderia ser construído pela junção do esqueleto do pRSM4 com os fragmentos das sequências de ori pSa, parAB e repA pelo método de clonagem por extensão circular da polimerase (CPEC) (QUAN et al., 2011), que pode ser uma alternativa caso já haja se tenha os fragmentos em outros plasmídeos que possam servir de molde para reações de PCR, não sendo necessária a síntese dos mesmos. Esta metodologia baseia-se na ligação de dois ou mais fragmentos de DNA por meio da complementariedade das extremidades das sequências de interesse que atuam como primers para uma reação de PCR, e essa complementariedade é criada através da reação de PCR com primers específicos em cada sequência e no vetor. O esquema da montagem do plasmídeo para as três sequências desejadas por meio dessa metodologia pode ser observado na figura 24.

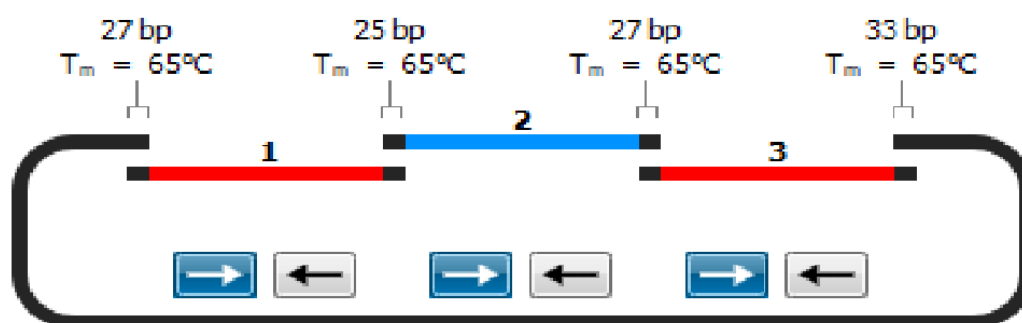


Figura 24. Esquema de montagem do plasmídeo pela técnica de CPEC. Evidencia-se as regiões de homologia criadas para alcançar as complementariedades que serão utilizadas na reação de PCR para união de todos os fragmentos. 1, 2 e 3 são os fragmentos da ori pSa, RepA e parAB, respectivamente.

Toda a simulação de montagem e desenho dos primers foi realizada através do software SnapGene utilizando a ferramenta Gibson Assembly para 3 fragmentos, e seguindo os parâmetros ideais descritos por Quan et al. (2011).

Para a etapa da montagem em bancada, primeiramente será necessário criar o vetor e os fragmentos com todas essas regiões de complementariedade de maneira individual através de reações de PCR, que no caso das novas sequências de interesse podem advir de síntese ou de recuperação de suas fontes de origem, o plasmídeo pUFR047 pode ser utilizado para recuperar as sequências tanto da ori pSa, quanto da região ParAB, já a sequência de RepA pode ser obtida do plasmídeo pSa. Para isso os primers da tabela 6 devem ser utilizados em seus respectivos fragmentos em reações individuais de PCR seguido os mesmos parâmetros descritos no item 4.4.

Tabela 6. Sequência dos primers para geração das extremidades complementares para CPEC.

Identificação	Sequência (5' – 3')
Primer F Vetor	CCCACAGAAGCCGCCCTAAGTTGTAATTCTCAGTTAGTCATGCCCCG
Primer R Vetor	GGGCTGTTGGATGGTATCGTATGGGGCTGACTTCAGGTG
Primer F ori pSa	GCCCCATACGATACCATCCAACAGCCCCG
Primer R ori pSa	TGTTCTTAGGCATGCGCTCGACGGTGGG
Primer F RepA	ACCGTCGAGCGCATGCCTAAGAACAACAAGCCCC
Primer R RepA	AATGCGGGGAATTCTCAAGTCGGAGGGGGGC
Primer F parAB	CCCTCCGACTTGAGAATCCCCGCATTGAAAATTAAGTGC
Primer R parAB	ATGAGAATTACAACCTTAGGGCGGCTTCTGTGGG

Após a PCR, uma corrida em gel de agarose será necessária para confirmar o tamanho dos fragmentos, seguido do corte correto das bandas específicas e realização da purificação das mesmas, e por último quantificação do DNA.

A etapa de CPEC propriamente dita será uma reação com volume final de 20µl conforme tabela 7. É necessário calcular o quanto será utilizado de inserto e vetor,

mantendo a proporção entre 1:1 e 2:1. Isso pode ser feito através da ferramenta disponibilizada no site (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>).

Tabela 7. Montagem da reação de CPEC.

Concentração inicial	Volume para 20 µl de reação	Quantidade final para 20 µl de reação
Tampão Phusion HF (5x)	4 µl	1x
Mix dNTP (40 mM)	0.4 µl	0.8 mM
DNA polymerase Phusion HF (2 U/µl)	0.2 µl	1 U
Vetor	Variável	100-200 ng
Inserto(s)	Variável	-
H ₂ O	Completar 20 µl de reação	

A reação de PCR que realizará a junção dos fragmentos deverá ser realizada usando os parâmetros descritos na Tabela 8. Lembrando que na reação de CPEC não acontece aumento no número de cópias do plasmídeo pois a polimerase irá apenas estender e ligar os fragmentos.

Tabela 8. Parâmetros da reação de CPEC.

Número de ciclos	Desnaturação	Rampa lenta de anelamento	Anelamento	Extensão
1	98 °C, 30s	-	-	-
2-26	98 °C, 10s	50 para 55 °C (0.1 °C/s), 3 min	55 °C, 30s	72 °C, 10-20s por Kb
27	-	-	-	72 °C, 5 min

Por fim, após a reação é possível realizar a quantificação do DNA e realizar a transformação da reação em células competentes para obter linhagens com o plasmídeo com todos fragmentos inseridos, como pode ser observado no esquema ilustrado na figura 25.

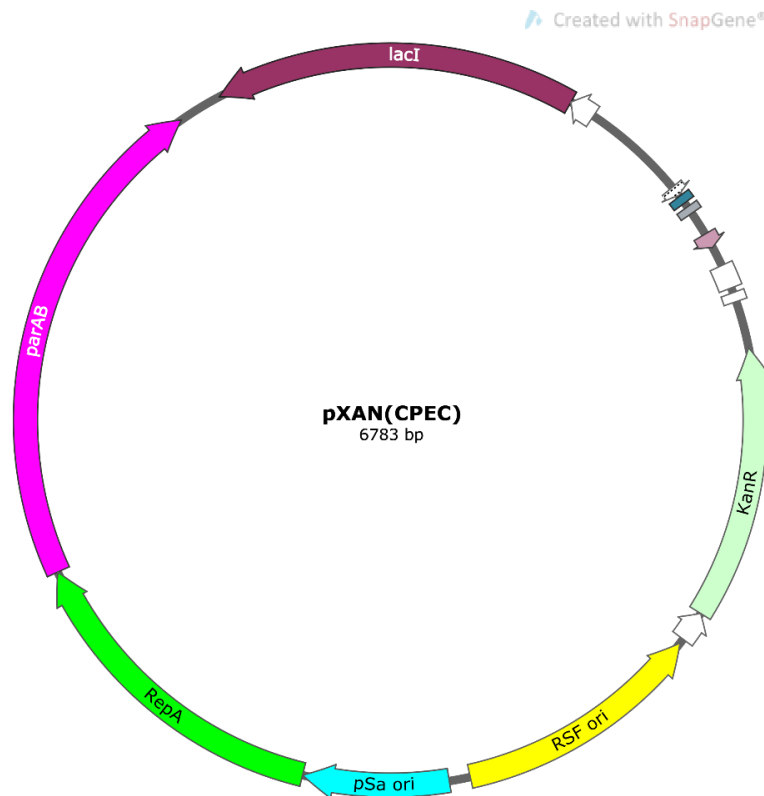


Figura 25. Esquema do plasmídeo proposto pXAN.

Salienta-se que a proposta do plasmídeo nomeado pXAN difere da proposta anterior do pSAM, não apenas pelas diferentes técnicas de clonagem dos fragmentos, por CPEC e por restrição, mas também pela escolha dos locais de inserção das sequências. pSAM ilustra a possibilidade de clivar a ori que já havia no pRSM4 anteriormente, deixando somente a nova pSa funcional, mas que também é funcional em *E. coli*, porém descrita como de baixa cópia. Já pXAN demonstra a inserção das novas sequências em região ao lado da ori RSF, deixando então duas ori's no plasmídeo, embora RSF não seja funcional em *Xanthomonas* ela é funcional em *E. coli* e descrita como de alta cópia, o que pode ser vantajoso em etapas iniciais de clonagens de genes de interesse.

Com isso as presentes propostas buscaram demonstrar diferentes caminhos para montagem de um plasmídeo que seja funcional em *Xanthomonas*, inserindo uma nova origem de replicação e novas sequências que foram julgadas necessárias para fornecer suporte a manutenção do plasmídeo dentro das células da dada espécie.

7. Conclusão

As ampliações e posteriores clonagens individuais dos genes de interesse para as enzimas UDPG-PP e UDPG-deH foram alcançadas com sucesso no plasmídeo pRSM4, além do sucesso da construção de um novo plasmídeo, o pRSM5, carregando a sequência CAP, e que posteriormente também recebeu os genes de interesse de maneira individual.

Apesar dos plasmídeos da série ePathBrick apresentarem diversas vantagens, como a enorme facilidade de manipulação e compatibilidade entre eles, mostrando-se altamente flexíveis na montagem de vias metabólicas, infelizmente não se mostraram funcionais para a expressão gênica em bactérias do gênero *Xanthomonas*, tanto pelo marcador de resistência ser de resistência natural do hospedeiro, no caso do pETM7, ou ainda pela origem de replicação dos outros plasmídeos não serem reconhecidas pelos mecanismos de replicação desta célula. Este tipo de dificuldade de baixa frequência de transferência de DNA e vetores não mantidos de forma estável em *Xanthomonas campestris* já foi relatada na literatura, como pelo grupo de DeFeyter. A mesma dificuldade foi observada neste trabalho, mas com a visão de aproveitar todas as vantagens dos plasmídeos da coleção ePathBrick foram desenvolvidas duas propostas de modificação dos mesmos para que passem a ser funcionais em *Xanthomonas* e se estabeleçam como plasmídeos de trabalho na espécie.

8. Referências

- AMARAL, A. M. do, Toledo, C. P., Baptista, J. C., & Machado, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, 30(3), 292–294, 2005.
- ARLAT, M., GOUGH, C. L., BARBER, C. E., BOUCHER, C. & DANIELS, M. J. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Plant-Microbe Interact** 4, 593–601, 1991.
- BECKER, A. et al. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 145–152, 1998.
- DE FEYTER R., Clarence I. Kado, Dean W. Gabriel, Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*, **Gene**, 88(1), 65-72, 1990.
- DE FEYTER R, Yang Y, Gabriel DW. Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. **Molecular Plant-microbe Interaction**, 6(2), 225-237, 1993.
- EBRIGHT, R. H., EBRIGHT, Y. W., GUNASEKERA, A. Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. **Nucleic Acid Research**, 17, 10295-10305, 1989.
- ELSHAFEI, G. M. S., EL-SAID, M. M., ATTIA, H. A. E. & MOHAMMED, T. G. M. Environmentally friendly pesticides: Essential oil-based w/o/w multiple emulsions for anti-fungal formulations. **Ind. Crops Prod.** 31, 99–106, 2010.
- GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549–579, 2000.
- GHOUMRASSI-BARR, S. & ALIOUCHE, D. A Rheological Study of Xanthan Polymer for Enhanced Oil Recovery. **J. Macromol. Sci. Part B** 55, 793–809, 2016.
- GLOBAL MARKET INSIGHTS. Xanthan Gum Market to register substantial gains at around 6% to 2023: **Global Market Insights**, Inc. 2019.

- HABIBI; KHOSRAVI-DARANI, Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2017.
- HARDING, N. E., CLEARY, J. M., CABANAS, D. K., ROSEN, I. G. & KANG, K. S. Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.** 169, 2854–2861, 1987.
- HE, Y. et al. *Xanthomonas campestris* cell–cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. **Mol. Microbiol.** 64, 281–292, 2007.
- JANI, G. K., SHAH, D. P., PRAJAPATI, V. D. & JAIN, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. **Asian J Pharm Sci** 4, 309–323, 2009.
- JEANES, A. Applications of extracellular micro-bial polysaccharide-polyelectrolytes: Review of literature, including patents. **Journal of Polymer Science: Polymer Symposia**, 45, 209–227, 1974
- KAMOUN, S. & KADO, C. I. A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. **J. Bacteriol.** 172, 5165–5172, 1990.
- KENNEDY, J.F. and BRADSHAW, I.J. Production, properties and applications of xanthan. **Progress in Industrial Microbiology**, 19, 319–371, 1984.
- K. KALNIN, Stegalkina S, Yarmolinsky M. pTAR-encoded proteins in plasmid partitioning. **J Bacteriol**, 182(7), 1889-1894, 2000.
- KUNDLATSCH, G. E. Universidade Federal de São Carlos Universidade Federal de São Carlos. 2017.
- MDIC. Comex Vis: Principais Produtos Importados PPI. 2019.
- NITSCHKE, Marcia; RODRIGUES, Vanessa. Effect of virulence and serial transfers of *Xanthomonas campestris* on xanthan gum production. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 58–60, 2000.
- PALANIRAJ, A. & JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **J. Food Eng.** 106, 1–12, 2011.
- PETRI, D. F. S., Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **J. Appl. Polym. Sci.**, 132, 42035, 2015.

- QIAN, Wei *et al.* Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 757–767, 2005.
- QUAN, J.; TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, v. 6, n. 2, p. 242–251, 2011.
- ROSALAM, S. & ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme Microb. Technol.** 39, 197–207, 2006.
- RYAN, R. P. *et al.* Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HDGYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 103, 6712–6717, 2006.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 3. ed. Nova Iorque: CSH Press, 2001, Vol. 1.
- SILVA, A. J. *et al.* Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production. **Metabolic Engineering**. v. 64, p. 15-25, 2021.
- SOBY, S. D., DANIELS M. J. Catabolite-repressor-like protein regulates the expression of a gene under the control of the *Escherichia coli* lac promoter in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Appl Microbiol Biotechnol** 46, 559–561, 1996.
- SNYDER, L. *et al.* *Molecular Genetics of Bacteria*. 4th. ed. Washington: ASM PRESS, 2013.
- SUTHERLAND I.W. Xanthan. **Xanthomonas**, 363-388, 1993.
- TAIT, R.C., Kado, C.I. & Rodriguez, R.L. A comparison of the origin of replication of pSa with R6K. **Molec Gen Genet** 192, 32–38, 1983.
- TAO, F., HE, Y.-W., WU, D.-H., Swarup, S. & Zhang, L.-H. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. **J. Bacteriol.** 192, 1020–1029, 2010.
- VORHÖLTER, F.-J. *et al.* The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. **J. Biotechnol.** 134, 33–45, 2008.
- WANG, X.; ZHENG, D.; LIANG, R. An Efficient Electro-Competent Cells Generation Method of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Its Application for Plasmid Transformation and Gene Replacement. **Advances in Microbiology**, v. 06, n. 02, p. 79–87, 2016.

XU, P. et al. EPathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, v. 1, n. 7, p. 256–266, 2012.

9. Anexos

>Sequência do plasmídeo pSAM1

```
cgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgctaccgttcatgggaga
aaataatactgttgatgggtgctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtcaggcagcttcaca
gcaatggcatcctggatccagcggatagtaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgcc
gctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccagctggcaccagttgatcggcgcgagattta
cgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcc
cgccagttgttgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgcatcgccgcttcacttttcccgcttttcgcagaa
acgtggctggcctgggtcaccacgcgggaaacggctgataagagacaccggcactctgcgacatcgataacgtt
actggttcacattcaccaccctgaattgactctctccggcgctatcatgccataccgcgaaaggtttgcgccattcga
tgggtgccgggatctcgacgctctccctatgagactcctgattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgag
caccgccgccaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgccaacagtccccggccacggggcctgccacc
ataccacgccgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatctccccatcggtgatgtcggcgatat
aggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgctgcccggcgtagcctaggatcAagatcg
atctgatcccgcgaaatTTTACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTggaattgtgagcg
gataacaattcccctctagaaataattttgttaactttaagaaggagatatacatatggcagatctcaattggatatcggc
cggccacgcgatcgtgacgtcggtagcctcgagctggttaaagaaccgctgctgcgaaattgaaccgacac
atggactcgtctactagtcgagcttaattaacctaaactgctgccaccgctgagcaataaccaggcatcaataaaa
cgaaaggctcagtcgaaagactgggccttctgtttatctgttgttgcggtagaacgctctctactagagtcacactggct
caccttcgggtgggccttctgcgtttataGctagcgaaaggaggatcgacaagctgacgaccgggtctccgcaagt
ggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaatta
tcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagc
cgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggatcgggtcgcgattccga
ctcgtccaacatcaatacaacctattaattcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgcgaaatcacatgagtgac
gactgaatccggtgagaatggcaaaagttaatgcatttcttccagactgttcaacaggccagccattacgctcgtcatc
aaaactcctcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgcgagacgaaatacgcggctcgtgttaa
aggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcgatcaacaatattttcacctga
```

atcaggatattcttctaatacctggaatgctgtttcccggggatcgcagtggtgagtaacatgcatcatcaggagtacg
gataaaatgcttgatggtcgaagaggcataaattccgctcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggc
aacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcacatcgggcttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattg
cccgacattatcgcgagcccatttataccatataaatcagcatccatgttggaattaatcgcggcctagagcaagac
gtttcccggtgaatatggctcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacata
ttgaatgtatttagaaaaataaacaataggcatgcagcgtcttccgcttctcgcctcactgactcgctacgctcggtc
gttcgactcggcgagcgggtgtcagctcactcaaaagcggtaatacggttatccacagaatcaggggataaagccg
gaaagaaCATGTcgcagaaaggcccacccgaaggtgagcCtcaagtcggagggggccgatgcgagcggc
cttgcggggtgcgagggtgacatgcaggcgtgtgattgatgcgcaggcattcgcgctatcttcgatgcagtcgcttg
cctcgggatagacaatcaacacttcgctgtaggcgcttttgaagttgatttgaagctggcgagtgctgcccgtctgccc
gctctcgggccttatcgtccagttcgggcgagttgctgctgcggctgcataggatgagccgaattgcgcttgcaaggc
gaccaagggatttgacgaaggggcgcccttggcccgaacaggaacacgcgataggtcagccacgtgtaa
gtccatcgaagcggagactgccgaaggcatgcaggtagtcgattcggataggaaccggtgagcgggtgactcc
tcgaagaaatcgctgtgagggtgagggtgctatcccatagcggccgatcttctggccgcttgggattccagaataga
aaagcgcgcttggcaatgacgacgttctcaatgccgaagtcattgccttgctcggcgcaagcgaatcatggatga
aaacaggcgttgcgctgattgcaaggggtggccgtgtaacggccatcgggtgtcattccgagcctttgtagaaattcc
gattgcgaccggccaaggtcaacacggggcttctcgttcgcacggcctcgggtgcatatccaagcaagcaaggtgcg
cggcatagaaccgtagggcagggccgatgctcggcttggccatgatcgacaaggtgacgatgccattggtgcgctcaa
agtagctggcttggggtcgggtgtggggcatggtcgttgcacaaggcaacgggcatgtagccgactaagccagctt
cggggcatcctccatttcgagcgcgaggctcgtcttgatgatctcgttgatacgatggccgggggcttgtgttcttagg
catTctccttctaaagttaaacaaAtgagaaggaaaaagtataataacttcgtaaatagtcccaataacagagtact
cgctatgtataaacttacataaatcttttattgtttGCGCTCGACGGTGGGCAACCGCTTGCGGTT
GTCCACGGGCGGAGCCGGTGC GCGTAGCGCATTGTCCACAAGCCAAGGGCGA
CCAATAATTGATATATATATTCATAATTGAAAAGCTAATTGAACATACTACTTGCT
GTA ACTACTTGCCGGAGCGAGGGGTGTTTGCAAGCTGTTGATCTGAAAGGGCT
ATTAGCGTTCTCACGTGCCTTTTTGATTAGCGATTTACGTGACCTTATTAGCGA
TTTCACGTACTCCGATTAGCGATTTACGTACCCTGATTAGCGATTTACGTGGA
TAGTTTTTGGAGCGGGCCGGAAAGCCCCGTGAATCAAGGCTTTGCGGGGCATT
AGCGGTTTACGTGGATAACTACCCTCTATCCACAGGCTTCCGGGGATAAAAAA
GCCCGCTCGACGGCGGGCTGTTGGATGGcgcagaaaggcccacccgaaggtgagcCTCA
TCCTTTGGCCTCCAAATACAGTGCCCATGCTTCCTCTATAATGACGCCTTGAC
GACGCCACGCCGCATAGCTTCCTCTGCGATTTCTTCGGAAACGTGCGGCAGCA
CTTTGGCGTGACCTGGCCGGTGC GCTCGCTCTTCTTGCGACCGGGCTTTCCG

CGCGGCGACCGATCAACGAACCCCCTCGCCTCCCCTACTGCGTCAGCCTTGGC
GATGGCCGCTTCGCTGGCCGGCTTCGCGGTCCGTTTCAGCGACCCTAGATCTA
GTTTGAAATCATTTCATCGCAGTGCCTCCGTTAGCTTCTTAAATATTGCCATGGCG
AAGGCCTCGGCGTTTTTCGATTGCCGCCGCCATATTGCCTTGCTTCGATTTTCATT
GAATGGAGATTGCCGCCGAAGTAAAAAGCGCGGAATATGCCGTCCGCTCTAC
AAGTGGCGGTTGCATGATTTCTACTCCGTTTTTCGATGAGTGATGCCTTGATGCC
GGTGTATTCATGTGAACGGATCGCGGGGCTAACCATGGTGAACACGACCGCAT
GAGCTATTTTCCGGTCTATTGCTTCTTCTTCTTCTGCAATCAGCTGTAGCGACTG
CGCGCCTATGGTTGCGTCCAGTGCCTTGGGGCGCATTGGAATTAGCACCAAGT
CTGCTTGAGATATTGCTCTAGAGACCATGCGCGACGCTACACCTTCAAGGTCAA
CAATGACCACGGCTCCATCAACGTCATGCTGCTTGATCGTCTTGACGATGCTGG
ATTCGGTTACGTCGCTTAGAGCTGTGATATTCTCCGGGACTTCCCCCGCGTTTG
CCCAAATAGTCAATGACCGGTTAGGGTCGCAATCCAACATGGTGACGGGGACA
CCCTTATGCGCAAGCTCGGTTCCAGCACACGGCGGTGGTGGATTTCCCTGC
CCCGCCCTTTGATGAAGCGACTACGACAACAGGCATTctccttctaaagttaaaciaAtga
gaaggaaaaagtataataacttcgtaaatagtccaataacagagactcgcctatgataaacttacataaatctttt
atttgtttCtcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgctttctccttcgggaagcgtggcg
ctttctcatagctcacgctgttggtatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccg
ttcagccccaccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgacttatcgccactggc
agcagccattgtaactgatttagaggactttgtcttgaagttatgcacctgttaaggtaaaactgaaagaacagattttg
gtgagtgcggtcctccaacccactaccttggttcaaagagttggtagctcagcgaaccttgagaaaaccaccgttgg
agcgggtggttttcttattatgagatgatgaatcaatcggctctatcaagtcaacgaacagctattccgttactctagattc
agtgaatttatcttcaaatgtagcacctgaagtcagcccatacagatataagttgtaattctcatgttagtcatgcccc
gcgcccaccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggctgagatcccgggtgcctaataagtgag
ctaacttacattaattgcgttgcgctcactgcccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcg
ccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggcgccagggtggttttctttcaccagtgagacgggcaacagct
gattgccctcaccgctggccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcct
gtttgatggtggttaacggcgggatataacatgagctgtcttcggatcgtcgtatcccactaccgagatgtccgcacca
acgcgagccccgactcggtaatggcgcgcatgcccagcggccatctgatcgttggaaccagcatcgcagtg
gaacgatgccctcattcagcatttgcattggttggtaaaaccggacatggcactccagtcgccttccggtccgctatcg
gctgaatttgattgagtgagatattatgccagccagccagacgcagacgcggagacagaacttaatgggcc

>Sequência do plasmídeo pXAN

cgtaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgctaccgtcttcatgggaga
aaataatactgttgatgggtgctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtcgaggcagctccaca
gcaatggcatcctggatccagcggatagtaatgatcagcccactgacgcgtgcgcgagaagattgtgcaccgcc
gctttacaggcttcgacgccgcttcgcttaccatcgacaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagattta
cgccgcgacaattgcgacggcgctgcagggccagactggaggtggcaacccaatcagcaacgactggttggc
cgccagttgttgccacgcggtgggaatgtaattcagctccgcatcgccgctccacttttcccgcttttcgcagaa
acgtggctggcctgggtcaccacgcgggaaacggctgataagagacaccggcactctgcgacatcgataacgtt
actggttcacattcaccaccctgaattgactcttccggcgctatcatgccataccgcgaaaggtttgcccattcga
tgggtcgggatctcgacgctctccctatgcgactcctgattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccgtgag
caccgcccgcgaaggaaatgggtgatgcaaggagatggcgccaacagtccccggccacggggcctgccacc
atacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatctccccatcggatgctggcgat
aggcgccagcaaccgcactgtggcgccggtgatgccggccacgatgctccggcgtagcctaggatcAagatcg
atctgatcccgcaaatTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTggaattgtgagcg
gataacaattcccctctagaaataatgtttaaacttaagaaggagatatacatatggcagatctcaattggatcggc
cggccacgcgatcgtgacgctcggtagctgtaaaagaaccgctgctgcgaaattgaaccgacgac
atggactcgtctactagtcgagcttaattaacctaaactgctgccaccgctgagcaataaccaggcatcaataaaa
cgaaaggctcagtcgaaagactgggccttctgtttatctgtttgtcgggtgaacgctctctactagagtcacactggct
cacctcgggtgggccttctgcgtttataGctagcgaaaggaggatcgacaagctgacgaccgggtctccgcaagt
ggcactttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttatcttaataacattcaaatatgtatccgctcatgaatta
tcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagc
cgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggatcggctcgcgattccga
ctcgtccaacatcaatacaacctattaattcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatcacatgagtgac
gactgaatccggtgagaatggcaaaagttagcatttcttcagactgttcaacaggccagccattacgctcgtcatc
aaaactcactcgcacatcaacaaaccggtattcattcgtgattgcgctgagcgagacgaaatacgcggctcgtgttaa
aggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcacatcaacaatatttcacctga
atcaggatattcttaataacctggaatgctgtttcccggggatcgagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtacg
gataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgctcagccagtttagtctgacctctcatctgtaacatcattggc
aacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcgggctcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattg
cccgacattatcgcgagcccattataccatataaatcagcatccatgttgaattaatcgcggcctagagcaagac
gtttcccgtgaaatggctcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacata
ttgaatgtatttagaaaaataacaaataggcatgcagcgctctccgcttctcgtcactgactcgtacgctcggct
gttcgactcggcgagcgggtgtcagctcactcaaaagcggtaatacggttatccacagaatcaggggataaagccg
gaaagaacatgtgagcaaaaagcaaagcaccggaagaagccaacgccgagggcgttttccataggctccgcc

ccctgacgagcatcacaanaaatcgacgctcaagccagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccagg
cgttccccctggaagctccctcgcgctctcctgttccgaccctgccgctaccggatacctgtccgcctttctccctcg
ggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgttggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgc
acgaacccccggttcagcccgaccgctgcgcttatccggttaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgact
tatgccactggcagcagccattggttaactgatttagaggactttgtcttgaagttatgcacctgttaaggctaaactgaa
agaacagattttggtgagtgcggtcctccaaccacttaccttggtcaaagagttggtagctcagcgaaccttgagaa
aaccaccgttggtagcgggtggtttttctttatgatgatgaatcaatcgggtctatcaagtcaacgaacagctattccg
ttactctagatttcagtgcaatttatcttcaaatgtagcacctgaagtcagccccatacagataCCATCCAACAG
CCCGCCGTGAGCGGGCTTTTTTATCCCCGGAAGCCTGTGGATAGAGGGTAGT
TATCCACGTGAAACCGCTAATGCCCCGCAAAGCCTTGATTCACGGGGCTTTCCG
GCCCGCTCCAAAACTATCCACGTGAAATCGCTAATCAGGGTACGTGAAATCGC
TAATCGGAGTACGTGAAATCGCTAATAAGGTCACGTGAAATCGCTAATCAAAAA
GGCACGTGAGAACGCTAATAGCCCTTTCAGATCAACAGCTTGCAAACACCCCTC
GCTCCGGCAAGTAGTTACAGCAAGTAGTATGTTCAATTAGCTTTTTCAATTATGAA
TATATATATCAATTATTGGTCGCCCTTGGCTTGTGGACAATGCGCTACGCGCAC
CGGCTCCGCCCGTGGACAACCGCAAGCGGTTGCCACCGTCGAGCGCAtgcctaa
gaacaacaaagccccggccatcgtatcaacgagatcatcaagacgagcctcgcgctcgaatggaggatgcc
gcgaagctggcttagtcggctacatggcccgtgcttgtgcaagcgaccatgccccacaccgacccaagaccag
ctactttgagcgcaccaatggcatcgtcaccttgcgatcatgggcaagccgagcatcggcctgccctacggttctatgc
cgcgcaccttgcttggatgatcaccgaggccgtgcaacgaaagaccccggttgaacctggccggctcgaat
cggaatttctacaaaggctcggaaatgcacaccgatggccgttacacggccacccttcgcaatcaggcgcaacgcctg
tttcatccatgatttcgcttgcggcgagcaaggcaatgacttcggcattgagaacgtcgtcattgccaagcgcgctttc
tattctggaatccaagcggccagaagatcgggctgatgggatagcaccctaccctcacaggcgatttctcgagg
aagtcacccgctcaccggtcctatccgaatcgactacctgcatgccttgcggcagctcctcgcttgcgatggacattac
acgtggctgacctatcgcgtgttctgttgcgggccaagggccgccccttcgtgcaaatcccttgggtcgcctgcaag
cgcaattcggctcatcctatggcagccgcgcacgcaactcggcgaactggacgataaggcccgagagcgggag
agcgggagcactcggcagctcaaatacaactcaaaaagcgcctacgcgaagtgttgattgtctatcccagggca
agcgactgcatcgaagatgacggcgaatgcctgcgcatcaaatccacacgcctgcatgtcaccgcgcacccggc
aagggcgctcgcacgccccctccgacttgaGAATTCCCCGCATTGAAAATTAAGTCTTCTT
TACTTTAGCCAGTCGGCATATCCGATTTGATGCGATACCCGGTTCATTGAAATAC
CGGGTAATTTGCCTTATCCGGTAATTGTAATTATCGGATTTGTGTAATACCCGG
TTGCAATCAAACCGGGTGTGTGTTTAAATCCGGTCAATTCATTTACCGGATTTA
ATTATTAATCCGATATCAACTTTTACCGGGTATTTGAATAAACCAGATTATCGATT

TAACCGGAGAATGACATATGCCTGTTGTCGTAGTCGCTTCATCAAAGGGCGGGG
CAGGGAAATCCACCACCGCCGTGGTGCTGGGAACCGAGCTTGCGCATAAGGGT
GTCCCGTCACCATGTTGGATTGCGACCCTAACCGGTCATTGACTATTTGGGCA
AACGCGGGGGAAGTCCCGGAGAATATCACAGCTCTAAGCGACGTAACCGAATC
CAGCATCGTCAAGACGATCAAGCAGCATGACGTTGATGGAGCCGTGGTCATTGT
TGACCTTGAAGGTGTAGCGTCGCGCATGGTCTCTAGAGCAATATCTCAAGCAGA
CTTGGTGCTAATTCCAATGCGCCCCAAGGCACTGGACGCAACCATAGGCGCGC
AGTCGCTACAGCTGATTGCAGAAGAAGAAGCAATAGACCGGAAAATAGCTC
ATGCGGTCTGTTCACCATGGTTAGCCCCGCGATCCGTTACATGAATACACCG
GCATCAAGGCATCACTCATCGAAAACGGAGTAGAAATCATGCAACCGCCACTTG
TAGAGCGGACGGCATATTCCGCGCTTTTTTCAGTTCGGCGGCAATCTCCATTCAA
TGAAATCGAAGCAAGGCAATATGGCGGGCGGCAATCGAAAACGCCGAGGCCTTC
GCCATGGCAATATTTAAGAAGCTAACGGAGGCACTGCGATGAATGATTTCAAAC
TAGATCTAGGGTCGCTGAAACGGACCGCGAAGCCGGCCAGCGAAGCGGCCAT
CGCCAAGGCTGACGCAGTAGGGGAGGCGAGGGGGTTTCGTTGATCGGTCGCCG
CGCGGAAAGCCCGTTCGCAAGAAGAGCGAGCGCACCGGCCAGGTGCACGCCA
AAGTGCTGCCGCACGTTTCCGAAGAAATCGCAGAGGAAGCTATGCGGCGTGCC
GTCGTGCAAGGCGTCATTATAGAGGAAGCATGGGCACTGTATTTGGAGGCCAA
AGGATGACGGAGCAAATGCGCTACAGGATTGAACATTCCGTCGAGGGCCGAGA
GCAGGTTATTCCGCTTGACGATCTTGACGTGAAGAAGGCGCGCAGTCGCGCAA
GGTCATTGAGCAAGCAAGACGATCAATTGGGGAATGGTCTCGGCCATAGCGTC
TATCTGATAGGCCAAGACGAGACGGGCACTGATCAGGAGCAATACATCTACAAC
GGCGGATCGCTGGCGGATAAAGACCTGGTCAAAGACTGGAAATAAGCCATCAA
TGCTCTCCCACAGAAGCCGCCtaagttgtaattctcatgtagtcatgccccgcgcccaccggaagga
gctgactggggtgaaggctctcaagggcatcggtcgagatcccgggtgcctaagtagtgagctaaactacattaattgcgt
tgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctggtccagctgattaatgaatcggccaacgcgcggggaga
ggcggttgcgtattgggcccaggggtggtttttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgctg
gccctgagagagttgcagcaagcgggtccacgctggttgcggcagcaggcgaaaatcctggttgatggtggttaacgg
cgggatataacatgagctgtcttcggtatcgtcgtatcccactaccgagatgtccgcaccaacgcgcagccccgactc
ggtaatggcgcgcatgctgcgcccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgagtgggaaacgatgccctcattca
gcattgcatgggttgtgaaaaccggacatggcactccagtcgcctcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagt
gagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgcccagacagaaactaatgggccc