

## **CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS PROMOTORES COM ATIVIDADE REPRESSIVA EM RESPOSTA AO AUTO-INDUTOR DE QUORUM SENSING (QS) TIPO 2 (AI-2) EM *Zymomonas mobilis***

Juliana de Fátima dos Santos Silva<sup>1</sup>; Daniela Leite Jabes<sup>2</sup>; Regina Costa de Oliveira<sup>3</sup>; Luiz Roberto Nunes<sup>4</sup>

1. Bacharela em Ciências Biológicas; e-mail: julianafsilva@outlook.com
2. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br
3. Coordenadora do Programa de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br
4. Orientador do Programa de Biossistemas da Universidade Federal do ABC; e-mail: luiz.nunes@ufabc.edu.br

Área do conhecimento: **Biologia molecular e de microorganismos**

**Palavras-chaves:** Promotores bacterianos; auto-indutor, *Zymomonas mobilis*

### **INTRODUÇÃO**

A bactéria Gram-negativa *Zymomonas mobilis* apresenta diversas características que a tornam atrativa para a produção industrial de diferentes bioprodutos, incluindo o bioetanol. Nesse sentido, destaque tem sido dado para a bactéria *Zymomonas mobilis*, uma vez que apresenta vantagens frente as leveduras no que diz respeito aos processos fermentativos, incorporação de subprodutos a sua biomassa e a própria produção de etanol (ROSSETO *et al.*, 2014). *Z. mobilis* é uma bactéria anaeróbica facultativa, capaz de crescer e produzir etanol em uma ampla faixa de pH (pH 3,5-7,5), além de exibir uma alta tolerância a este álcool (12-15%) em comparação com outros organismos etanologênicos (PANESAR *et al.*, 2006). Diversas vias metabólicas de *Z. mobilis* vêm sendo manipuladas, através da incorporação de novos transgenes ao seu genoma, de maneira otimizar a bactéria na produção de bioprodutos (LEE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2018). No entanto, este processo envolve não apenas a incorporação de novos genes de interesse ao genoma bacteriano, mas também sua integração a elementos capazes de garantir sua expressão e localização apropriadas, como promotores e peptídeos sinais para exportação (APTEKMANN & NADRA, 2018). Promotores bacterianos são sequências de DNA conservadas que sinalizam e dirigem a transcrição de um gene adjacente ou de um grupo de genes à partir de um promotor central (*core promoter*). O promotor possui elementos conservados (como os elementos -10 e -35, por exemplo) no qual reconhecem o fator  $\sigma$  presente na RNA polimerase e definem a afinidade e precisão da expressão gênica. Desta forma, promotores atuam de maneira constitutiva e poucos são descritos sendo controlados por fatores exógenos (por exemplo, promotores induzidos por lactose (ou análogos, como arabinose) e triptofano) (BROWNING *et al.*, 2019). Diversos estudos atualmente buscam identificar promotores/genes modulados em um fenômeno denominado *Quorum Sensing* (QS), caracterizado por um sistema de comunicação química de microrganismos, baseado na emissão de estímulos e respostas dependentes da densidade populacional. Então, o QS regula diversos fenótipos desencadeando mudanças no comportamento em uma escala comunitária. Essa comunicação é mediada pequenas moléculas sinalizadoras denominadas auto-indutores (AIs) (HERZOG *et al.*, 2019). Três tipos de moléculas indutoras são descritas na literatura sendo o foco deste trabalho a molécula de auto-indutor do tipo 2 (AI-2), um sinalizador transespecífico de *Quorum sensing*. A estrutura básica do AI-2 é uma 4,5-di-hidroxi-2,3-pentadiona (DPD) que cicliza espontaneamente para gerar uma série de derivados que se interconvertem espontaneamente entre diferentes formas (XAVIER & BASSLER, 2004; YANG, 2011; HERZOG *et al.*, 2019). Yang

(2011) realizou os primeiros estudos relacionando a indução do *quorum sensing* por AI-2 em *Z. mobilis*, uma bactéria incapaz de produzir esta molécula. Porém, os testes foram conduzidos utilizando sobrenadante derivado de *Escherichia coli*, uma bactéria sabidamente produtora de AI-2, podendo haver diversas outras variáveis envolvidas no processo. Tornou-se necessário a realização de testes com AI-2 puro, sintético, com concentrações pré-estabelecidas, para verificar se, de fato, o *quorum sensing* em *Z. mobilis* poderia ser induzido por AI-2 e as mudanças transcriptômicas desencadeadas.

## OBJETIVOS

Identificar e caracterizar elementos promotores com atividade repressiva em resposta ao auto indutor de *quorum sensing* (QS) tipo 2 (AI-2) em *Zymomonas mobilis* (linhagem ZM4 - ATCC 14990) através da técnica de RNA-Seq e validar os dados obtidos através da técnica de PCR quantitativo.

## METODOLOGIA

*Z. mobilis* foi submetida ao crescimento, em meio mínimo, na presença do AI-2 na concentração de 45 µM, além de réplicas controle (sem adição do composto). Em cada ensaio foi adicionado AI-2 às culturas quando apresentavam  $DO_{600} = 0,6$ , o que corresponde a fase exponencial de crescimento (14 h). Após adição do AI-2, a  $DO_{600}$  foi lida a cada hora até a fase estacionária de crescimento (20 h). O RNA total foi extraído de cada cultura utilizando o kit *Qiagen RNeasy* (QIAGEN©) segundo as recomendações do fabricante. A qualidade das amostras foi avaliada por eletroforese capilar em aparelho BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). A depleção do RNA ribossomal das amostras foi realizada com auxílio do kit *Ribo-Zero rRNA removal kit (Gram-Negative bacteria - Illumina)* segundo recomendações do fabricante. O RNA resultante foi submetido a quantificação em um fluorímetro Quantus (Promega) e a qualidade da depleção foi verificada também por eletroforese capilar. A preparação das bibliotecas de RNA-seq foi realizada com o kit *ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit* (Illumina), que prepara bibliotecas unidirecionais a partir das amostras de RNA previamente enriquecidas, com índice em apenas uma das extremidades. A qualidade das bibliotecas foi avaliada por eletroforese capilar e a quantificação foi feita com o kit *NEBNext® Library Quant Kit for Illumina* (New England Biolabs®), segundo recomendações do fabricante, para a preparação de um *pool* contendo 2 nM de cada biblioteca para sequenciamento sendo utilizada a plataforma *NextSeq™ 550 Sequencing System* (Illumina) junto ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP - GENIAL) da Universidade de São Paulo. Após o sequenciamento, o alinhamento obtido através dos *reads* gerados foram analisados contra o genoma de referência de *Z. mobilis* utilizando o software Rockhopper (McCLURE *et al.*, 2013) sendo possível identificar os genes diferencialmente expressos ( $q\text{-Value} < 0,01$ ). De maneira a validar os genes sub-regulados observados através do experimento de RNA-seq, foram selecionados os que apresentaram a maior sub-regulação e com  $q\text{Value} < 0,01$  e, para os normalizadores, foram selecionados genes que não obtiveram modulação estatisticamente significativa nas condições testadas. Utilizando a plataforma IDT (*Integrated DNA Technologies*) foram desenhados *primers* capazes de amplificar as sequências de genes com características de sub-regulação. O cDNA foi sintetizado segundo recomendação do fabricante: Superscript II RT (200 U/µL – Invitrogen) e purificado com kit Microcon YM-30 (Millipore). Cada qPCR foi realizada em triplicata, sendo constituída de: 100 ng de cada cDNA, 100 nM de cada primer (Forward e Reverse) e 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix 2x® (Applied Biosystems). As reações foram realizadas no aparelho *ABI Prism® 7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), todas em triplicata. Para normalização dos experimentos, foi utilizado o controle ZMO1124 (*Fis family transcriptional regulator*), uma vez que sua expressão gênica não apresentou variação nas condições avaliadas nos ensaios

de RNA-Seq. As regiões intergênicas foram isoladas com auxílio da base de dados NCBI e caracterizadas com a ferramenta BPROM.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados pela curva de crescimento demonstraram que as células, quando expostas a concentração estabelecida de 45  $\mu$ M de AI-2, apresentaram alterações em seu crescimento compatíveis com o esperado no processo de *quorum sensing*, uma vez que diminuíram seu ritmo de crescimento quando comparados ao grupo controle (Teste T:  $p = 0,02$ ). O RNA total extraído apresentou RIN (Número de Integridade do RNA) acima de 8, indicando excelente qualidade das mostras. A depleção do RNA ribossomal foi eficiente, uma vez que a porcentagem de rRNA remanescente foi inferior a 1 %. As bibliotecas apresentaram perfil homogêneo e valor médio de 450 pb. Os reads obtidos através do RNA-seq apresentaram alinhamento de 85% contra o genoma de referência de *Z. mobilis* e estes dados foram validados através de ensaios de qPCR, com a seleção de 14 genes para análise do perfil de expressão gênica (6 superexpressos e 8 subregulados). A correlação entre estas duas metodologias independentes foi de 85% (Pearson 0,8852 e Spearman 0,7890). Poucos estudos têm sido dedicados a caracterização de promotores de *Z. mobilis*. Desta forma, o entendimento das modulações ocasionadas pela indução do *quorum sensing* por uma molécula exógena, como o AI-2, nos fornece um campo de estudo inédito para o entendimento de transgenes que possam ser ligados ou desligados, de maneira controlada em *Z. mobilis*. Como observado pela curva de crescimento, houve mudança tanto no perfil de crescimento da bactéria na presença de AI-2, como de expressão gênica, sendo observados 1014 genes ( $qValue < 0,01$ ) com modulações estatisticamente significativas, o que corresponde a 55% do total de genes da bactéria. Dentre estes genes, 925 se apresentaram superexpressos e 89 subregulados. A análise transcriptômica nos trouxe informações acerca de genes bem descritos na literatura como característicos do processo de *quorum sensing* de diversos microorganismos como *Pseudomonas* spp. *Streptococcus* spp. e *E. coli* por exemplo. Em *Z. mobilis*, alguns destaques na modulação foram os genes relacionados a receptores de membrana, como membros da família TonB, transportadores ABC, reguladores de quimiotaxia e fatores de transcrição. No que diz respeito aos promotores, foram isoladas 5 regiões intergênicas relacionadas a genes subregulados, e seus elementos -10 e -35 foram caracterizados. Além disso, 3 operons preditos se apresentaram subregulados, estando relacionados a síntese de RNA mensageiro e transportador.

## CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram a eficiente construção de bibliotecas de RNA-Seq da bactéria *Zymomonas mobilis* e sua modulação fenotípica e gênica em resposta ao auto indutor de *quorum sensing* AI-2. Sendo assim foi observada que a resposta da bactéria *Z. mobilis* ao autoindutor, apesar de não possuir genes que sintetizem esta molécula, foi capaz de mostrar ação no crescimento da cultura já que induziu a resposta a sua fase estacionária e na mudança do perfil de expressão gênica. Com isto, foram identificados 1014 genes modulados sendo 995 superexpressos e 89 subregulados. Os dados obtidos pela construção das bibliotecas de RNA-Seq foram corroborados através da metodologia de PCR quantitativo sendo obtida correlação de ~80%. Além disto, regiões promotoras de genes subregulados, em resposta ao AI-2, foram isolados e caracterizadas em relação aos elementos -35 e -10 presentes no promotor central. Tais regiões serão melhor caracterizadas em estudos posteriores, podendo ser utilizadas para desenvolver sistemas controlados por esta molécula. Foram encontrados 3 operons multigênicos modulados negativamente na presença do AI-2, estando relacionados a diminuição da síntese de RNAs mensageiros e transportadores.

## REFERÊNCIAS

APTEKMANN, A. A.; NADRA, A. D. Core promoter Information content correlates with optimal growth temperature. **Scientific Reports**. 8: 1313, 2018.

BROWNING, D. F.; GODFREY, R. E.; RICHARDS, K. L.; ROBINSON, C.; BUSBY, S. J. W. Exploitation of the *Escherichia coli* lac operon promoter for controlled recombinant protein production. **Biochemical Society Transactions**. <https://doi.org/10.1042/BTS20190059>. 2019.

HERZOG, R.; PESCHEK, N.; FRÖHLICH, K. S.; SCHUMACHER, K.; PAPENFORT, K. Three autoinducer molecules act in concert to control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Nucleic Acids Research**. 47 (6), 3171-3183. 2019.

LEE, K. Y.; PARK, J. M.; KIM, T. Y.; YUN, H.; LEE, S. Y. The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 94-106, 2010.

PANESAR, P. S.; MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. **J Chem Technol Biotechnol**, 81: 623-635, 2006.

ROSSETO, P.; GAVIOLI, A. C.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Melhoramento genético microbiano baseado na engenharia genética: o caso dos microorganismos produtores de etanol. **Revista UNINGÁ Review**. Vol.17, No.1, 48-53, 2014.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. L. Regulation of Uptake and Processing of the Quorum-Sensing Autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**. 238-248, 2004.

YANG, J. W. Enhanced bioethanol production by *Zymomonas mobilis* in response to the quorum sensing molecules AI-2. Ph. D. Thesis. **Durham theses**, 2011. Durham University. Disponível em: <<http://etheses.dur.ac.uk/3231/>>. Acesso em: 01/08/2019.

ZHANG, K.; LU, X.; JIANG, X.; LIU, L.; WANG, H. New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 103:2087-2099. 2019.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade de Mogi das Cruzes pela bolsa de estudo e pela oportunidade de realização deste projeto. E aos amigos de laboratório e professores por toda ajuda e conhecimento compartilhado.