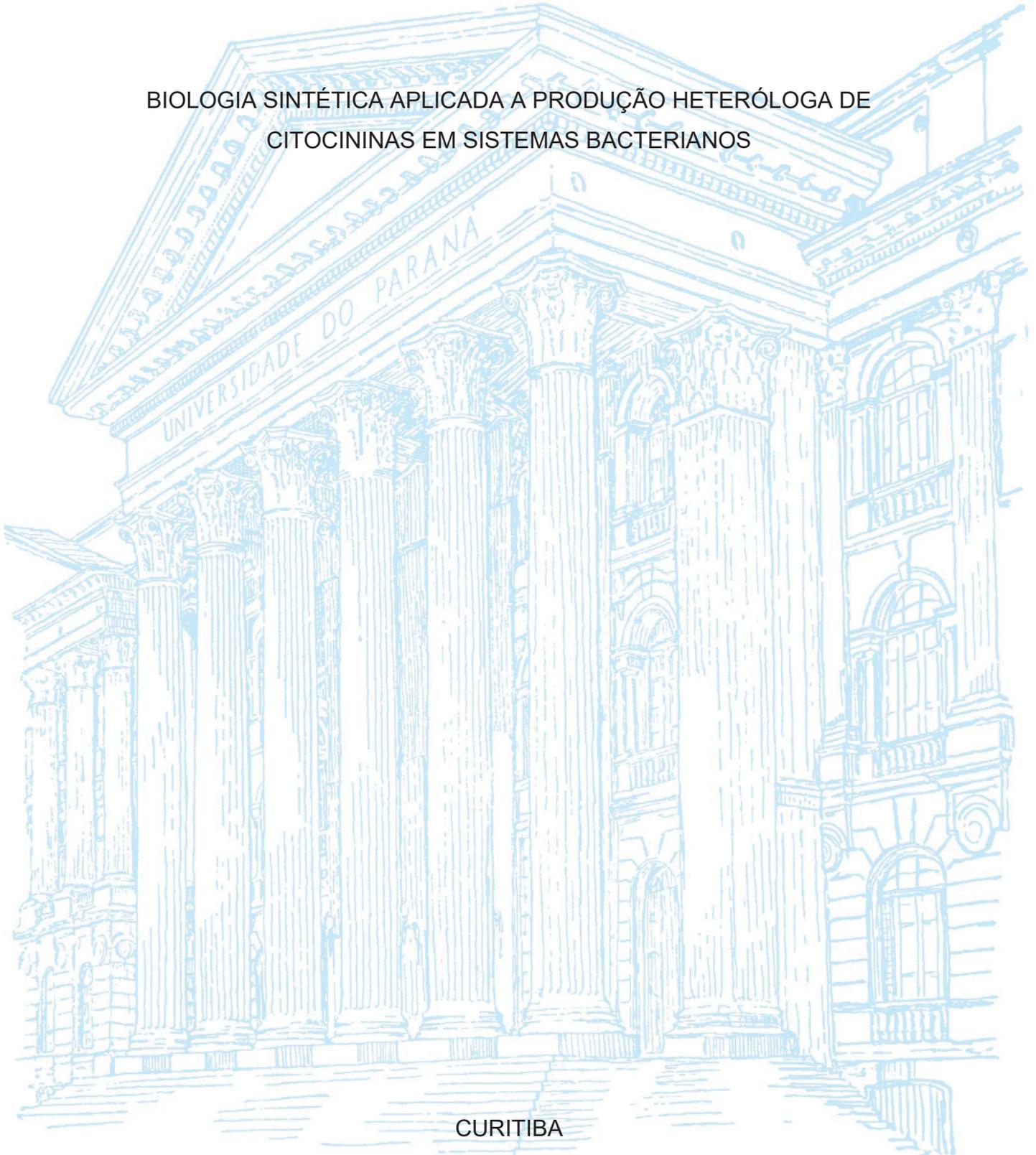


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RYU MASAKI

BIOLOGIA SINTÉTICA APLICADA A PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE
CITOCININAS EM SISTEMAS BACTERIANOS



CURITIBA

2021

RYU MASAKI

BIOLOGIA SINTÉTICA APLICADA A PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE
CITOCININAS EM SISTEMAS BACTERIANOS

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação Ciências (Bioquímica), Setor Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Masaki, Ryu.

Biologia sintética aplicada a produção heteróloga de citocininas em sistemas bacterianos. / Ryu Masaki. – Curitiba, 2021.

116 f. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira Pedrosa.

Coorientador: Marcelo Müller dos Santos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Citocininas. 2. Hormônios vegetais. 3. Biotecnologia. 4. Biossíntese. 5. Escherichia coli. 6. Bactérias. I. Título. II. Pedrosa, Fábio de Oliveira. III. Santos, Marcelo Müller dos. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (22. ed.) 581.165



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

ATA N°322

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

No dia vinte e oito de abril de dois mil e vinte e um às 09:00 horas, na sala Defesa Remota, Defesa remota., foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **RYU MASAKI**, intitulada: **Biologia sintética aplicada a produção heteróloga de citocininas em sistemas bacterianos**, sob orientação do Prof. Dr. FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ADRIANA SILVA HEMERLY (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO), LEDA SATIE CHUBATSU (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA (DEPARTAMENTO BOTÂNICA - UFPR). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 28 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica
28/04/2021 18:44:10.0
FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
28/04/2021 17:36:13.0
LEDA SATIE CHUBATSU
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
29/04/2021 21:28:12.0
ADRIANA SILVA HEMERLY
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica
28/04/2021 18:39:27.0
HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO BOTÂNICA -
UFPR)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 90157

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 90157



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RYU MASAKI** intitulada: **Biologia sintética aplicada a produção heteróloga de citocininas em sistemas bacterianos**, sob orientação do Prof. Dr. FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica
28/04/2021 18:44:10.0
FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
29/04/2021 21:28:12.0
ADRIANA SILVA HEMERLY
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica
28/04/2021 17:36:13.0
LEDA SATIE CHUBATSU
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
28/04/2021 18:39:27.0
HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO BOTÂNICA - UFPR)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 90157

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 90157

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus e à espiritualidade, pela minha vida e pelas bênçãos que recebo dela.

Agradeço à família e amigos, por todo apoio que recebi durante essa etapa da minha vida.

Agradeço a meus orientadores, Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa e Prof. Marcelo Müller dos Santos, por me aceitarem como aprendiz, pelos ensinamentos e pela amizade.

Agradeço ao Prof. Emanuel Maltempi de Souza, pela colaboração ao trabalho.

Agradeço aos técnicos, professores e alunos do Programa de Pós-Graduação Bioquímica da UFPR, pela amizade, pelos conselhos e pelo auxílio prestado ao longo do curso. Vocês são praticamente uma segunda família para mim.

Agradeço ao prof. Hugo Pacheco de Freitas Fraga e pela prof^a Carem Gledes Vargas Rechia, pela colaboração com testes de atividade biológica em plantas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Bioquímica da UFPR, pela oportunidade dada a mim de cursar a pós-graduação.

Agradeço às agências financiadoras (CAPES e CNPq), pelo suporte financeiro a este trabalho.

*You're filled with
DETERMINATION.*
– Undertale

RESUMO

Citocininas são fitohormônios que atualmente possuem aplicação na área de biotecnologia vegetal, como micropropagação de plantas e produção de metabólitos secundários vegetais. Além disso, citocininas possuem potencial de uso como promotores de crescimento vegetal, uma vez que regulam diversos aspectos de interesse agroindustrial como o aumento da produtividade de grãos, frutas e biomassa, a nodulação de leguminosas e a resistência à stress de origem abiótica e de origem biológica. Entretanto, a produção desses fitohormônios é cara, seja por síntese química, seja por extração de tecidos vegetais, cuja concentração está na faixa de pmol/g de massa fresca. O presente trabalho propõe a expressão de genes de vias de biossíntese de citocininas, como o gene *ipt4a* que codifica a isopentenil adenilato transferase 4v de *Arabidopsis thaliana* e o gene *tmr* que codifica a isopentenil ou dimetilalil transferase de *Agrobacterium tumefaciens*, em *E. coli* MG1655 para produzir citocininas de forma heteróloga. Usando um sistema de detecção baseado em um receptor de citocininas de planta (AHK4) expresso por uma bactéria sensora (*E. coli* KMI001) que expressa β -galactosidases induzida por citocininas, detectou-se a presença desse fitohormônio tanto no sobrenadante dos cultivos quanto no citosol de bactérias recombinantes expressando as enzimas Tmr e Ipt4. Descobriu-se que enzimas intracelulares da bactéria interagem com as citocininas produzidas pela reação enzimática das enzimas Tmr e Ipt4, o que as tornam detectáveis ao sistema de detecção por bactéria sensora e permite que sejam excretadas para o sobrenadante. Também realizaram-se cultivos de células vegetais de tomate (*Solanum lycopersicum*) e observou-se a formação de calo quando o citosol das bactérias recombinantes foi usado como substituto à citocinina sintética BAP, demonstrado que a citocinina produzida pelas bactérias recombinantes possui atividade biológica. Esse trabalho tem como perspectivas identificar e purificar a citocinina produzida pelas bactérias desenvolvidas nesse trabalho, assim como testar a atividade biológica do sobrenadante dessas bactérias em plantas, e transferir o sistema de produção de citocininas para bactérias promotoras de crescimento vegetal como *Azospirillum brasilense* FP2.

Palavras-chave: Biologia sintética. Citocininas. Hormônios vegetais. Biotecnologia. Biossíntese. *Escherichia coli*. Bactérias.

ABSTRACT

Cytokinins are phytohormones that currently have application in plant biotechnology, such as plant micropropagation and production of plant secondary metabolites. In addition, cytokinins can be used as plant growth promoters since they regulate several aspects of agro-industrial interest such as increasing grain, fruit and biomass productivity, legume nodulation and resistance to abiotic and biological stress. However, producing these phytohormones is expensive, either by chemical synthesis or by extraction of plant tissues, whose concentration is in the range of pmol/g of fresh mass. The present work proposes expression of cytokinin biosynthesis pathways genes, such as the IPT4a gene that encodes isopentenyl adenylate transferase 4v from *Arabidopsis thaliana* and the *tmr* gene that encodes isopentenyl or dimethylallyl transferase from *Agrobacterium tumefaciens* in *E. coli* MG1655 for heterologous cytokinin production. Using a detection system based on plant cytokinin receptor (AHK4) expressed by sensing bacterium (*E. coli* KMI001) that expresses cytokinin-induced β -galactosidase, the presence of this phytohormone was detected both in culture supernatant and in the cytosol of recombinant bacteria expressing the enzymes Tmr and Ipt4. It was discovered that intracellular enzymes of these bacteria interact with cytokinins produced by enzymatic reaction of the enzymes Tmr and Ipt4, which makes them detectable to the detection system by sensor bacteria and allows these molecules to be excreted into the supernatant. Tomato (*Solanum lycopersicum*) plant cells were also cultivated, and callus formation was observed when cytosol of the recombinant bacteria was used as a substitute for synthetic cytokinin BAP, demonstrating that cytokinins produced by recombinant bacteria have biological activity. This work aims to identify and purify the cytokinins produced by the bacteria developed in this work, test the biological activity of supernatant of these bacteria in plants, and transfer the cytokinin production system to plant growth-promoting bacteria such as *Azospirillum brasilense* FP2.

Keywords: Synthetic biology. Cytokinins. Plant hormones. Biotechnology. Biosynthesis. *Escherichia coli*. Bacteria.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Citocininas isoprenóides comumente encontradas em tecidos vegetais.....	18
Figura 2. Via metabólica de biossíntese de citocininas em plantas.....	19
Figura 3. Reação de isoprenilação de tRNA em plantas.....	20
Figura 4. Reações de O-glicosilação, N-glicosilação e degradação de citocininas.....	22
Figura 5. Sistema de dois componentes de sinalização de citocininas presente em plantas.....	24
Figura 6. Bio-ensaio de detecção de citocininas em <i>E. coli</i> (cepa KMI001: Δ rcsC, cps::lacZ) e receptores de citocininas AHK3/AHK4.....	26
Figura 7. Representação esquemática de enzimas IPT1-9 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
Figura 8. Mecanismo de reação de IPT e tRNA-IPT.....	29
Figura 9. Clonagem upstream através do sistema Biobricks.....	32
Figura 10. Clonagem downstream através do sistema Biobricks.....	33
Figura 11. Produção de grãos em arroz com diferentes níveis endógenos de citocininas.....	35
Figura 12. Grãos de cevada com diferentes níveis endógenos de citocininas.....	36
Figura 13. Efeito da aplicação de citocinina sintética (CPPU) em frutos de kiwi.....	37
Figura 14. Ensaio ELISA de citocininas presentes no sobrenadante de <i>E. coli</i> expressando enzimas Tmr de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e Ipt de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
Figura 15. Configuração final das construções contendo tmr ou IPT4.....	42
Figura 16. Curva de calibração para <i>E. coli</i> KMI001 usando receptor CRE1/AHK4.....	61
Figura 17. Curva de calibração para <i>E. coli</i> KMI001 usando receptor AHK3.....	62
Figura 18. Bio-ensaio para detecção de citocininas no extrato butanólico do sobrenadante de culturas de <i>E. coli</i> MG1655 selvagem e recombinante (pKtmr), usando <i>E. coli</i> bio-sensora (KMI001) e receptores CRE1/AHK4 e AHK3.....	64
Figura 19. Cinética de crescimento de <i>E. coli</i> selvagem e recombinante (pKtmr) em meio mínimo M9 durante 60h de cultivo.....	67

Figura 20. Cinética de produção de β -galactosidase induzida em <i>E. coli</i> sensora expressando o receptor AHK4 por citocininas presentes no sobrenadante de <i>E. coli</i> recombinante (pKtmr) em meio mínimo M9 durante 60h de cultivo.	68
Figura 21. Bio-ensaio para detecção de citocininas no sobrenadante e no citosol de <i>E. coli</i> recombinante com genes tmr e IPT4 sob regulação de promotores induzíveis.	69
Figura 22. Atividade β -galactosidase do citosol de <i>E. coli</i> MG1655 transformada com plasmídeos contendo promotor T5-lac (K592008) e Lac (R0010).	72
Figura 23. Bio-ensaio para detecção de citocininas no sobrenadante de <i>E. coli</i> recombinante com promotor T5-Lac (K592008).	74
Figura 24. Bioensaio para detecção de citocininas no sobrenadante de <i>E. coli</i> recombinante com promotor Lac (R0010).	75
Figura 25. Força de promoção de transcrição de diferentes promotores constitutivos em <i>E. coli</i> MG1655 cultivada em meio M9 suplementado.	77
Figura 26. Efeito da inativação do sítio ativo da enzima Tmr na quantidade de citocininas secretadas por <i>E. coli</i> MG1655 recombinante.	79
Figura 27. Efeito da inativação do sítio ativo da enzima tmr na quantidade de citocininas presente no interior celular de <i>E. coli</i> MG1655 recombinante.	80
Figura 28. Bioensaio para detecção de citocininas no sobrenadante de <i>E. coli</i> recombinante com promotores constitutivos.	82
Figura 29. Correlação entre produção de citocinina extracelular e força de promoção da expressão gênica em <i>E. coli</i> expressando gene tmr.	83
Figura 30. Bioensaio para detecção de citocininas na biomassa de <i>E. coli</i> recombinante com promotores constitutivos.	84
Figura 31. Bio-ensaio de detecção de citocininas em sobrenadante de <i>E. coli</i> MG1655 recombinante cultivadas em diferentes meios de cultivo.	86
Figura 32. Bio-ensaio de detecção de citocininas em citoplasma de <i>E. coli</i> MG1655 recombinante cultivadas em diferentes meios de cultivo.	87
Figura 33. Padrões de citocininas analisadas em LC-MS.	89
Figura 34. Cromatograma sobreposto de íon 204,1244 \pm 0,05 de padrão de iP e do extrato butanólico de sobrenadante de cultivo de <i>E. coli</i> pKtmr.	90
Figura 35. Espectro de massa de pico de iP em extrato butanólico de <i>E. coli</i> recombinante pKtmr.	91

Figura 36. Cromatograma sobreposto de íon $204,1244 \pm 0,05$ de padrão de iP e de extrato butanólico de fração solúvel do citosol de cultivos de <i>E. coli</i> MG1655 selvagem e recombinante (pKtmr e pKipt).	92
Figura 37. Hipótese de desfosforilação de citocininas produzidas por <i>E. coli</i> recombinante.....	93
Figura 38. Ativação (desfosforilação) de citocininas por enzimas do citoplasma e/ou periplasma de <i>E. coli</i>	94
Figura 39. Hipóteses para ativação de citocininas produzidas por <i>E. coli</i> recombinante.....	95
Figura 40. Análise de domínios proteicos em transportador de nucleosídeos de <i>E. coli</i> MG1655, NupC, através de ferramenta de bioinformática Pfam.	97
Figura 41. Análise de domínios proteicos em transportador de purina de <i>A. brasilense</i> , PZR08826.1, através de ferramenta de bioinformática Pfam.	97
Figura 42. Análise de domínios proteicos em transportador de nucleosídeos de <i>A. brasilense</i> , PZP41335.1, através de ferramenta de bioinformática Pfam. ...	98
Figura 43. Hipótese sobre excreção de citocininas produzidas em <i>E. coli</i> recombinante.....	98
Figura 44. Produção de calo de <i>Solanum lycopersicum</i> usando citocinina comercial e produzida por <i>E. coli</i> recombinante.....	99

Lista de Tabelas

Tabela 1. Promotores induzíveis e constitutivos usados para clonagem	41
Tabela 2. Plasmídeos construídos nesse trabalho	42
Tabela 3. Plasmídeos usados nesse trabalho	43
Tabela 4. Sequências de genes e partes genéticas usadas nesse trabalho	43
Tabela 5. Estirpes de E. coli usadas nesse trabalho	47
Tabela 6. Composição do meio Lysogenic Broth (LB)	48
Tabela 7. Reação de PCR para mutagênese sítio-dirigida	49
Tabela 8. Parâmetros utilizados para PCR de mutagênese sítio-dirigida	50
Tabela 9. Plasmídeos obtidos através de PCR de mutagênese sítio-dirigida ..	50
Tabela 10. Primers usados nesse trabalho	51
Tabela 11. Reação de PCR para sequenciamento	51
Tabela 12. Parâmetros utilizados para PCR de sequenciamento	52
Tabela 13. Composição do meio M9 suplementado	53
Tabela 14. Composição do meio M9.....	54
Tabela 15. Composição do Meio MS	57
Tabela 16. Estimativa de concentração de citocininas no sobrenadante de E. coli MG1655 recombinante pKtmr usando E. coli KMI001 com receptor CRE1/AHK4.	65
Tabela 17. Estimativa de concentração de citocininas no sobrenadante de E. coli MG1655 recombinante pKtmr usando E. coli KMI001 com receptor AHK3.	65
Tabela 18. Padrões de citocininas analisadas em LC-MS.	88
Tabela 19. Composição do Buffer XF (10x concentrado).....	116

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMP: Adenosina monofosfato

ADP: Adenosina difosfato

ATP Adenosina trifosfato

CKX: Citocinina oxigenase

CYP: Monooxigenase do citocromo P450

cZ: *Cis*-zeatina

DMAPP: dimetilalil pirofosfato

DZ: Dihidrozeatina

HMBDP: hidroximetilbutenil difosfato

iP: Isopentenil-adenina

iPR: Isopentenil-adenosina

iPRMP: Isopentenil-adenosina monofosfato

iPRDP: Isopentenil-adenosina difosfato

iPRTP: Isopentenil-adenosina trifosfato

IPT: Isopentenil tranferase de adenosina fosfato de plantas superiores

LOG: Lonely guy (fosforibohidrolase de nucleotídeos)

PGPR: Rizobactéria promotora de crescimento vegetal

RFP: Proteína fluorescente vermelha

TMR: Isopenteniltransferase de adenosina fosfato de *Agrobacterium tumefaciens*

tRNA: RNA transportador

tRNA-IPT: Isopentenil transferase de tRNA

tZ: *Trans*-zeatina

tZR: *Trans*-zeatina ribosídeo

tZRMP: *Trans*-zeatina ribosídeo monofosfato

tZRDP: *Trans*-zeatina ribosídeo difosfato

tZRTP: *Trans*-zeatina ribosídeo trifosfato

Sumário

1. Revisão Bibliográfica	17
1.1. Citocininas	17
1.2. Biossíntese <i>de novo</i> de citocininas em plantas.....	18
1.3. Biossíntese de citocininas através de tRNA.....	20
1.4. Metabolismo de citocininas em plantas.....	21
1.5. Sinalização de citocininas em plantas.....	22
1.6. Enzimas isopentenil transferase (IPT) de plantas e bactérias	26
1.6.1. IPTs de plantas superiores.....	26
1.6.2. IPTs de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
1.7. Mecanismo de reação das isopentenil transferases em plantas e bactérias	28
1.8. Biologia Sintética.....	29
1.8.1. Montagem de circuitos genéticos sintéticos	30
1.9. Uso biotecnológico de citocininas	33
2. Objetivos	40
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. Metodologia	41
3.1. Técnicas de clonagem de DNA.....	41
3.1.1. Propagação e manutenção de bactérias.....	48
3.1.2. Extração e manutenção de plasmídeos	48
3.1.3. Transformação de plasmídeos em bactéria	48
3.2. Mutagênese sítio-dirigida dos genes <i>tmr</i> e IPT4.....	49
3.3. Sequenciamento de plasmídeos.....	51
3.4. Cultivo de <i>E. coli</i> para produção de citocininas.....	52

3.5. Extração de citocininas	53
3.6. Bio-ensaio para detecção de citocininas	53
3.7. Análise de citocininas por Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS).....	55
3.8. Análise de proteínas através de ferramentas de bioinformática	55
3.9. Caracterização da força de transcrição dos promotores da família Anderson.....	56
3.10. Teste biológico de citocininas em plantas	56
3.11. Análise estatística	58
4. Resultados e Discussão	59
4.1. Validação do bio-ensaio para detecção de citocininas.....	59
4.2. Caracterização inicial da produção de citocininas em <i>E. coli</i> recombinante	63
4.3. Cinética de crescimento e de produção de citocininas em <i>E. coli</i> recombinante	65
4.4. Caracterização de produção de citocininas usando promotores induzíveis	68
4.5. Caracterização de produção de citocininas usando promotores constitutivos	76
4.6. Caracterização de citocininas produzidas por <i>E. coli</i> recombinante	88
4.7. Atividade biológica de citocininas produzidas por <i>E. coli</i> recombinante em plantas	99
5. Análise Crítica da Tese	101
7. Perspectivas	105
8. Referências Bibliográficas	107
9. Anexos	114
9.1. Construção dos plasmídeos através do sistema Biobricks	114

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Citocininas

Citocininas são hormônios vegetais ou fito-hormônios – como auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, brassinosteróides e ácido jasmônico – que promovem o crescimento vegetal (YAMAGUCHI et al., 2010). Citocininas foram inicialmente definidas como substâncias que, na presença de auxinas, induziam a multiplicação celular de tecidos vegetais e exerciam funções regulatórias de crescimento, da mesma maneira que a cinetina, um artefato da autoclavagem de extratos de DNA de esperma de peixe e nomeada assim devido à sua atividade promotora de citocinese em plantas (YAMAGUCHI et al., 2010; ZÜRCHER; MÜLLER, 2016; JAMESON, 2017). A primeira citocinina natural foi extraída de grãos de milho e nomeada de zeatina, sendo atualmente chamada de *trans*-zeatina (JAMESON, 2017).

Citocininas são compostos derivados de adenina com uma cadeia conjugada na posição N⁶ e são classificadas como isoprenóides ou aromáticas de acordo com o grupamento ligado à base nitrogenada (KAMADA-NOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009). Na natureza, as citocininas isoprenóides são muito mais abundantes do que as aromáticas (JAMESON, 2017). As principais citocininas isoprenóides presentes em plantas são isopentenil-adenina (iP), *trans*-zeatina (tZ), *cis*-zeatina (cZ) e dihidrozeatina (DZ) (Figura 1). As citocininas iP e tZ são as mais abundantes em plantas (SEO et al., 2016), embora haja variação dependendo da espécie, tecido e estágio de desenvolvimento da planta (SAKAKIBARA, 2006). Além das nucleobases, citocininas também são encontradas na forma de nucleosídeos, nucleotídeos e O- ou N-glicosídeos (ZÜRCHER; MÜLLER, 2016). As formas conjugadas são menos ativas ou mesmo biologicamente inativas devido à baixa afinidade ou incapacidade de interagir com os receptores de citocininas de plantas (SEO et al., 2016).

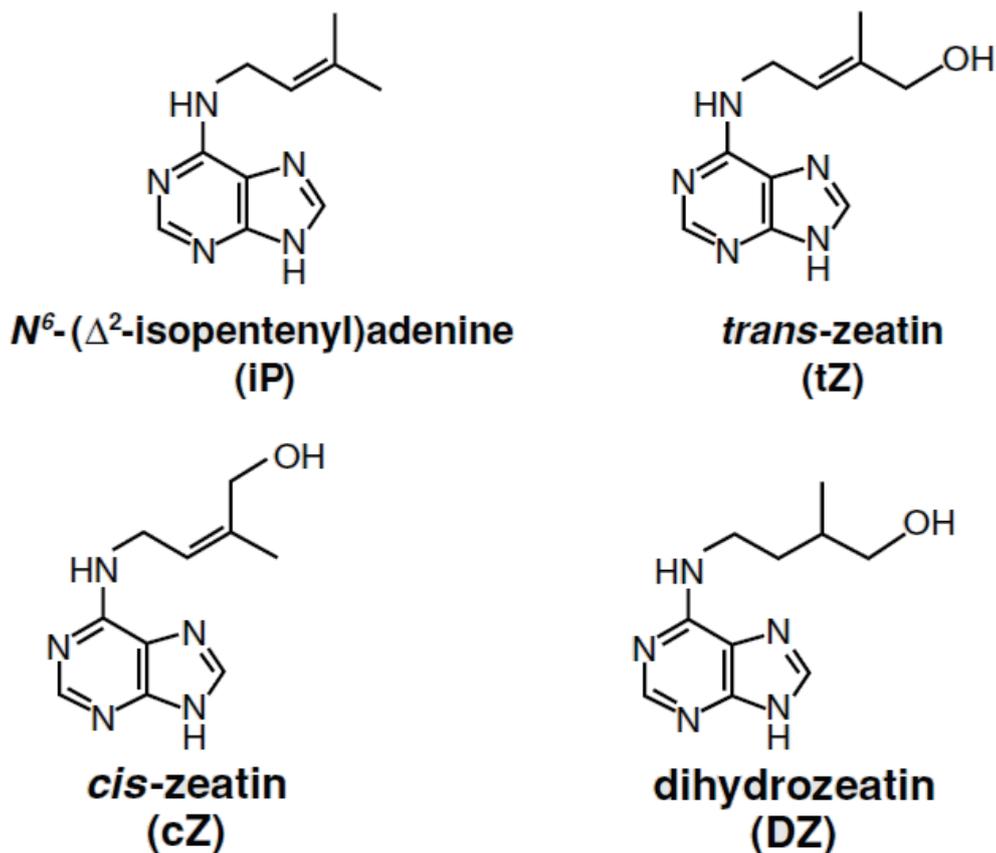


Figura 1. Citocininas isoprenóides comumente encontradas em tecidos vegetais.

Fonte: SAKAKIBARA, 2006.

1.2. Biossíntese *de novo* de citocininas em plantas

Ao contrário da via de biossíntese de citocininas aromáticas, da qual ainda pouco se sabe a respeito, a principal via de produção de citocininas isoprenóides em plantas já está bem documentada na literatura (Figura 2). A via se inicia com a transferência de um grupo isoprenil do dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) para adenosina mono, di ou tri-fosfato (AMP, ADP ou ATP, respectivamente), gerando nucleotídeos mono, di ou tri-fosfatados de isopentenil-adenina (iPRMP, iPRDP ou iPRTP, respectivamente). Essa reação é catalisada por uma enzima chamada isopentenil transferase (IPT; EC 2.5.1.27), e é a etapa limitante da biossíntese (SAKAKIBARA, 2006; JISKROVÁ et al., 2015). A cadeia isoprenil pode ser hidroxilada por mono-oxigenases do citocromo P450 (CYP735A1 e CYP735A2) para produzir nucleotídeos mono, di ou tri-fosfatados de *trans*-zeatina (tZRMP,

tZRDP ou tZRTP, respectivamente) (SAKAKIBARA et al., 2005; JISKROVÁ et al., 2015). Alternativamente, células vegetais infectadas com o plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* expressam uma enzima isopentenil transferase chamada TMR que usa como doador de isoprenil o metabólito hidroxi-metil-butenoil-difosfato (HMBDP, um precursor do DMAPP) e AMP para produzir diretamente tZRMP (SAKAKIBARA et al., 2005). Em ambos os casos, a nucleobase, forma biologicamente ativa da citocinina, é posteriormente liberada da ribose fosfato por uma fosforibohidrolase LONELY GUY (LOG) (KUROHA et al., 2009).

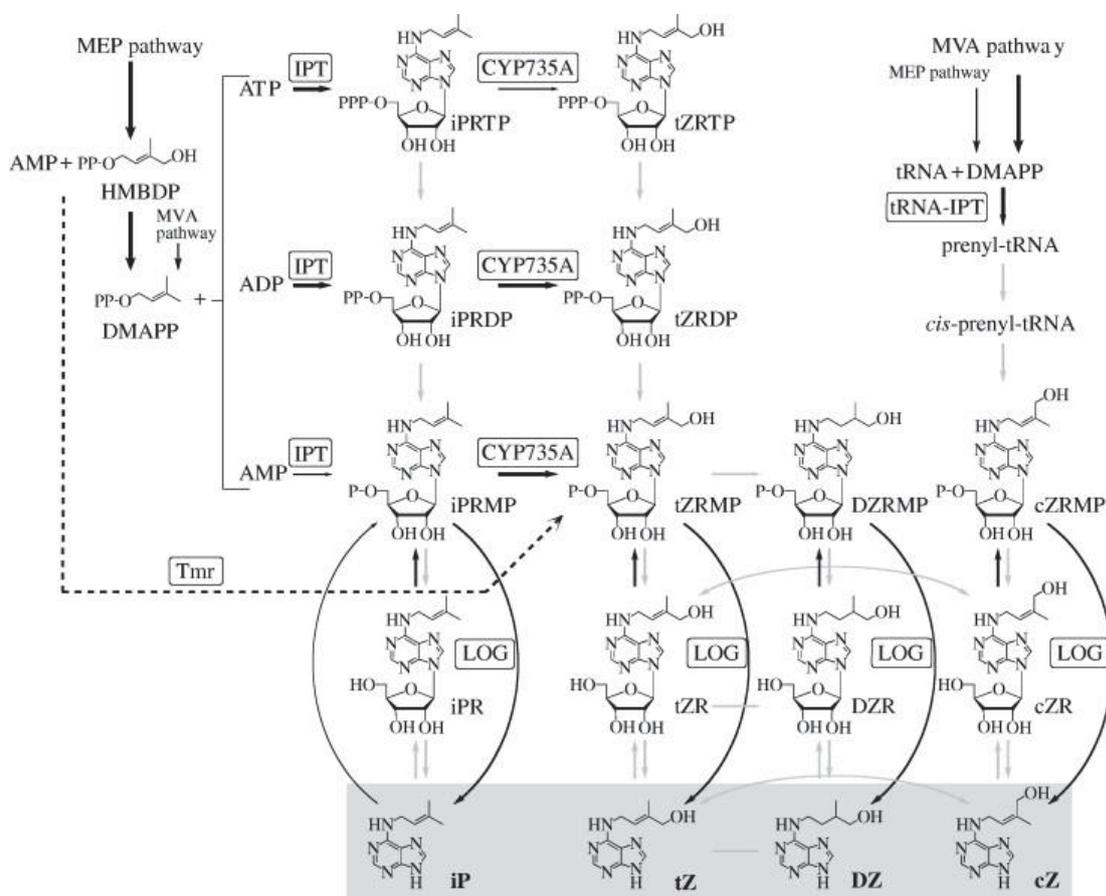


Figura 2. Via metabólica de biossíntese de citocininas em plantas.

Fonte: KAMADA-NOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009.

Citocininas são normalmente produzidas nas raízes, em sementes em desenvolvimento, na base de folhas, em gemas laterais e frutos (JAMESON, 2017). Em geral, a produção de citocininas ocorre em células diferentes das células receptoras, atuando como sinais parácrinos (ZÜRCHER; MÜLLER,

2016). Fito-hormônios parácrinos atuam sobre as células vizinhas à célula produtora.

1.3. Biossíntese de citocininas através de tRNA

Embora não seja a principal forma de produção de citocininas em plantas, uma via alternativa de produção de citocininas envolve a degradação de tipos específicos de tRNA (SAKAKIBARA, 2006). Nos tRNAs de plantas, a adenina adjacente à primeira posição 3' dos anticódons iniciados com adenina é isoprenilada (Figura 3). Essa modificação serve para estabilizar o pareamento intrinsecamente fraco entre essa base e uridina e estabilizar o complexo mRNA-ribossomo durante a tradução. Dessa forma, garantem a eficiência e fidelidade da interação códon-anticódon e a manutenção da fase de leitura (PERSSON et al., 1994; YAMAGUCHI et al., 2010; HELM; ALFONZO, 2014). A isoprenilação de adeninas adjacentes ao anticódon de tRNAs ocorre em praticamente todos os organismos, com exceção do domínio Archaea (PERSSON et al., 1994; SAKAKIBARA, 2006).

Em plantas, a isoprenilação de tRNA ocorre por intermédio de enzimas chamadas isopentenil transferase de tRNA (tRNA-IPT; EC 2.5.1.8) (KAMADA-NOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009; GHOSH et al., 2018). A degradação desses tRNAs produz cis-zeatina (cZ), sendo a principal via de produção dessa molécula (Figura 2) (MIYAWAKI et al., 2006).

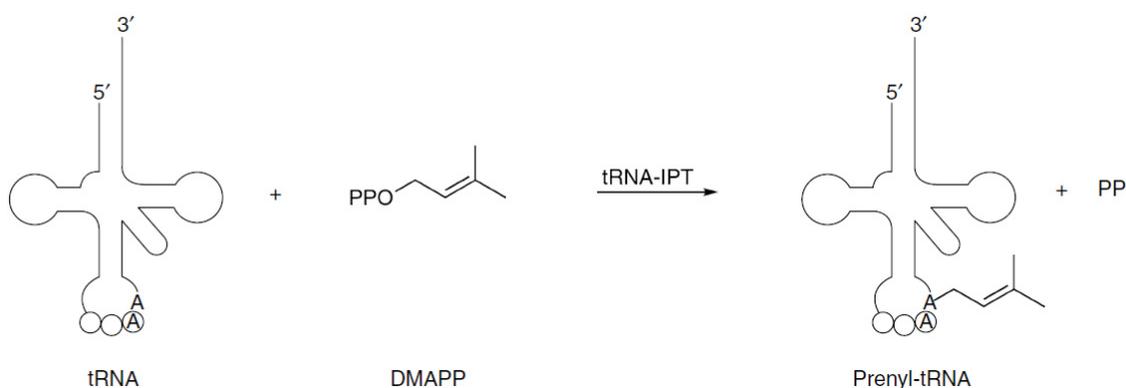


Figura 3. Reação de isoprenilação de tRNA em plantas.

Fonte: YAMAGUCHI et al., 2010.

1.4. Metabolismo de citocininas em plantas

Em plantas, o metabolismo de citocininas pode ocorrer como conversão entre tipos diferentes de citocininas, conjugação com glicosídeos ou degradação. Citocininas modificadas constituem estoques que podem ser rapidamente ativadas. Acredita-se que essas modificações têm o propósito de controlar os níveis de citocininas biologicamente ativas nos tecidos vegetais, e consequentemente manter o balanço hormonal da planta (ZÜRCHER; MÜLLER, 2016).

Em uma das possíveis modificações (Figura 2) o grupo isoprenil de *trans*-zeatina (tZ) pode ser hidrogenado por uma enzima chamada zeatina redutase para a formação de dihidrozeatina (DZ) (YAMAGUCHI et al., 2010). Sabe-se que ocorre a interconversão entre os isômeros *trans* e *cis* de zeatina (tZ e cZ), embora esta via ainda seja pouco caracterizada (JAMESON, 2017). A atividade biológica de citocininas está relacionada à sua afinidade de ligação com os receptores de citocininas (CHU et al., 2010). A conversão entre tipos diferentes de citocininas pode servir para modular a atividade biológica da molécula ou para conferir especificidade na interação citocinina-receptor, uma vez que cada receptor possui um espectro específico de ligantes (SAKAKIBARA, 2006; ZALABÁK et al., 2013).

Além da conversão de um tipo de citocinina a outro, outra modificação da cadeia lateral de citocininas envolve a O-glicosilação por uma D-glucose ou xilose em uma hidroxila da ponta da cadeia lateral (Figura 4) (YAMAGUCHI et al., 2010). Essa reação torna a molécula biologicamente inativa (JAMESON, 2017) e resistente à degradação por enzimas do tipo citocinina desidrogenase (CKX) (ZALABÁK et al., 2013). A reação é reversível e pode ser desfeita através da ação de β -galactosidases (SAKAKIBARA, 2006). Essa característica indica que a planta usa esse tipo de modificação para estocar citocininas biologicamente inativas (ZALABÁK et al., 2013).

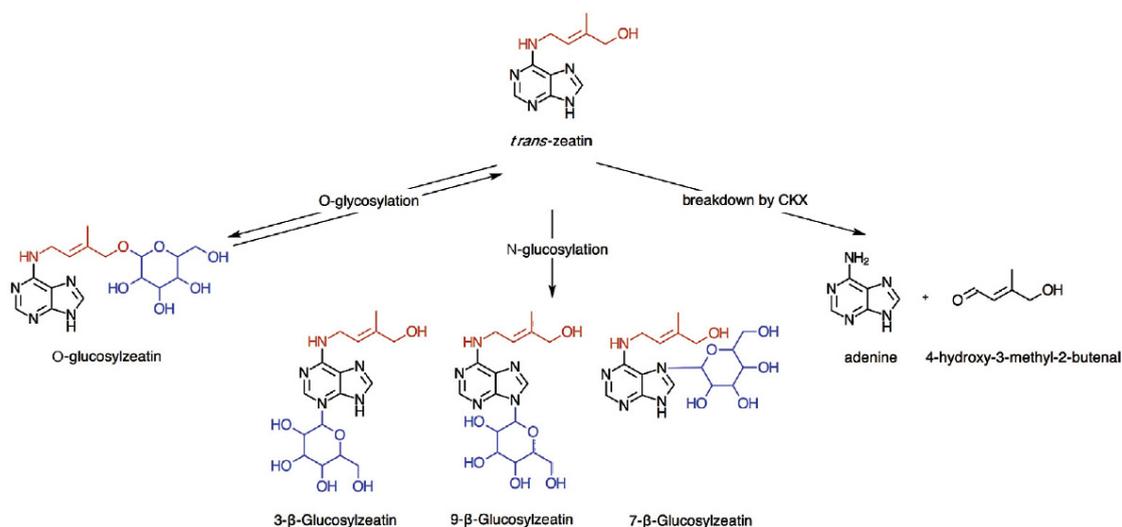


Figura 4. Reações de O-glicosilação, N-glicosilação e degradação de citocininas.

Fonte: ZÜRCHER; MÜLLER, 2016.

A inativação de citocininas pode também ocorrer através de conjugação de uma D-glucose nas posições 3, 7 e 9 da base nitrogenada (Figura 4) (JAMESON, 2017). Esse tipo de modificação é irreversível e ocorre como uma forma de reciclagem de citocininas nos tecidos vegetais (ZÜRCHER; MÜLLER, 2016).

A degradação de citocininas envolve a remoção da cadeia lateral do anel da adenina por um grupo de enzimas denominadas citocinina desidrogenase (CKX; EC 1.5.99.12) (Figura 4) (ZALABÁK et al., 2013). CKXs têm preferência por citocininas de cadeia insaturada (iP, tZ e cZ e seus respectivos nucleotídeos e nucleosídeos) e N-glicosiladas. Modificações na cadeia lateral envolvendo saturação e/ou O-glicosilação protegem essas moléculas da degradação por CKXs (ZALABÁK et al., 2013; ZÜRCHER; MÜLLER, 2016).

1.5. Sinalização de citocininas em plantas

O sistema de detecção e sinalização de citocininas por células vegetais envolve um sistema de transdução de sinal de dois componentes (ZALABÁK et al., 2013; GU et al., 2018). Sistemas de dois componentes são comuns em procariotos e eucariotos inferiores (SPÍCHAL, 2011) e são compostos por dois tipos de proteínas: um sensor do tipo histidina quinase (HK) e uma proteína

reguladora de resposta (RR) (GU et al., 2018). Ao receber um estímulo, a HK se auto-fosforila em um resíduo de histidina conservado no domínio quinase. A proteína transmite esse sinal através da transferência do grupo fosfato para um resíduo conservado de aspartato do domínio receptor do RR. Esta proteína, por sua vez, promove diversos tipos de respostas na célula, através da ativação da transcrição de diferentes genes/operons. Em alguns casos, a transferência de sinal entre a histidina quinase e a reguladora de resposta ocorre por intermédio de uma outra proteína chamada transferidora de fosfato (HP) (TO; KIEBER, 2008).

Em plantas, os receptores de citocininas presentes na membrana plasmática e na membrana endoplasmática têm um domínio de ligação extracelular ciclase/histidina quinase associadas ao sensoriamento extracelular (CHASE), um domínio de transmissão e dois domínios receptores de fosfato (SPÍCHAL et al., 2004; ZALABÁK et al., 2013; GU et al., 2018). Citocininas interagem com o domínio CHASE desses receptores e induzem a auto-fosforilação dessas proteínas, que transferem o grupo fosfato para as proteínas transferidoras de fosfato (HP) (ZALABÁK et al., 2013). As HPs movem-se ativamente para dentro e fora do núcleo celular, de forma independente do seu estado de fosforilação e da presença de citocininas externas. Dentro do núcleo, HPs fosforiladas transferem o grupamento fosfato para proteínas reguladoras de resposta (RR) (ARGUESO et al., 2010) (Figura 5). RRs podem ser de dois tipos, A e B. RRs do tipo B possuem um domínio GARP de ligação ao DNA, servindo como ativadores de transcrição. RRs do tipo A possuem apenas um domínio de recebimento de grupo fosfato e servem como reguladores da sinalização de citocininas (ZALABÁK et al., 2013; GU et al., 2018).

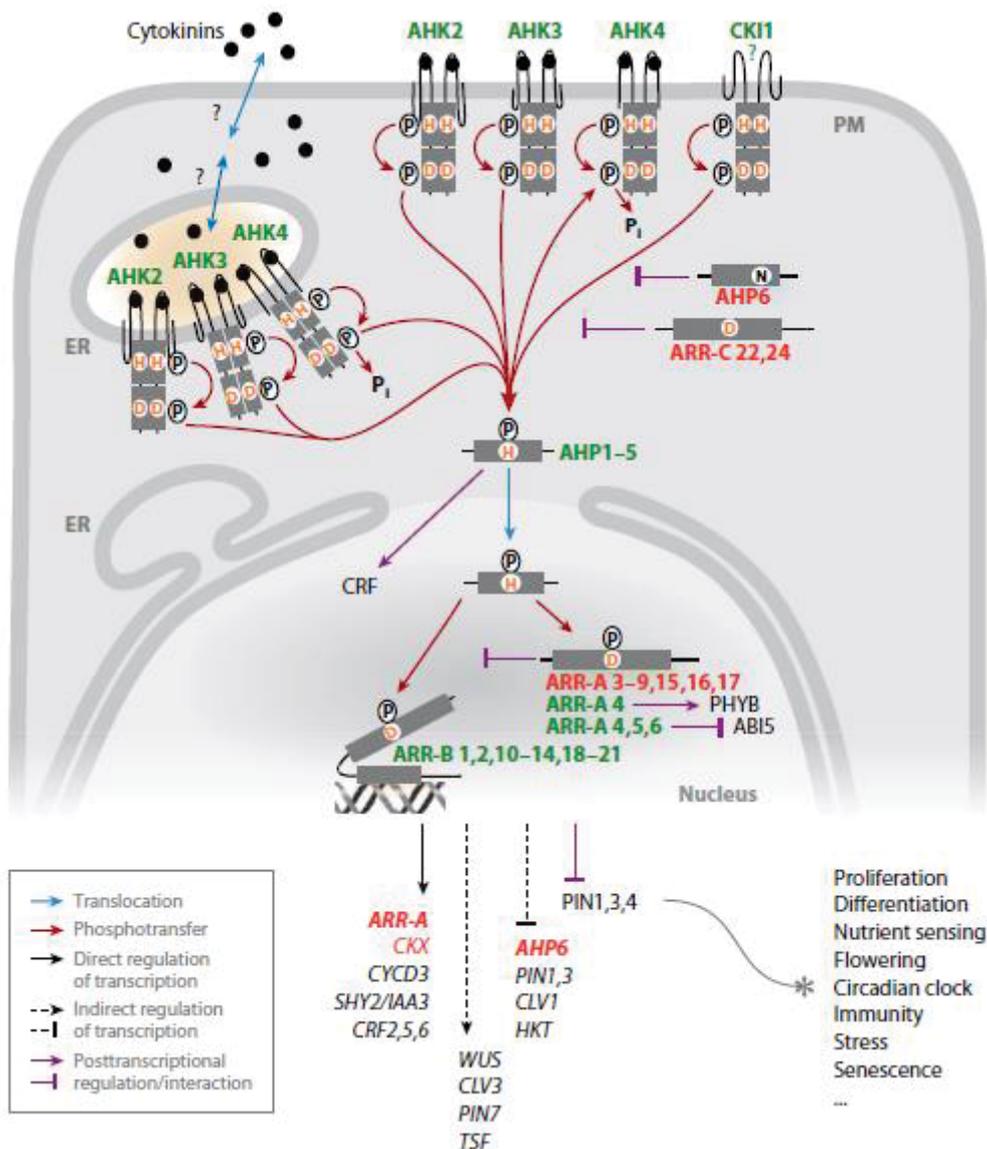


Figura 5. Sistema de dois componentes de sinalização de citocininas presente em plantas.

Fonte: HWANG et al., 2012.

O sistema de dois componentes de sensoriamento de citocininas de *Arabidopsis thaliana* foi transferido para leveduras (*S. cerevisiae* e *S. pombe*) e bactéria (*E. coli*) (INOUE et al., 2001; SUZUKI et al., 2001) visando demonstrar complementação genética heteróloga. Os receptores AHK2/AHK3/AHK4 de *Arabidopsis thaliana* assemelham-se estruturalmente ao receptor RcsC de *E. coli*, e quando expressos nessa bactéria ativam o operon *cps*, do qual o receptor RcsC faz parte (SUZUKI et al., 2001). O operon *cps* regula a síntese do ácido colônico, um polissacarídeo capsular extracelular, e o comportamento de

swarming da bactéria. A transcrição dos genes *cps* é ativada por uma cascata de transmissão de sinais que envolve a proteína receptora RcsC, uma proteína transferidora de fosfato YojN e um regulador de resposta RcsB (TAKEDA et al., 2001), em estrutura semelhante ao sistema para percepção de citocininas em plantas (SUZUKI et al., 2001).

Expressos em uma *E. coli* modificada (cepa KMI001: $\Delta rcsC$, *cps::lacZ*), os receptores AHK3/AHK4 de *Arabidopsis thaliana* podem ser usados como um bio-ensaio rápido e sensível para a detecção de citocininas (Figura 6). Na estirpe KMI001, os receptores AHK3 ou AHK4 ao interagirem com citocininas se autofosforilam e transferem o grupo fosfato para a proteína YojN e consequentemente RcsB, levando a expressão do operon *cps*. Portanto, ao inserir o gene *lacZ* sobre controle do promotor *cps*, a presença de citocininas desencadeia a produção de β -galactosidase de forma proporcional à concentração de citocininas presentes no meio. A atividade da enzima β -galactosidase é facilmente determinada quantitativamente (SPÍCHAL, 2011).

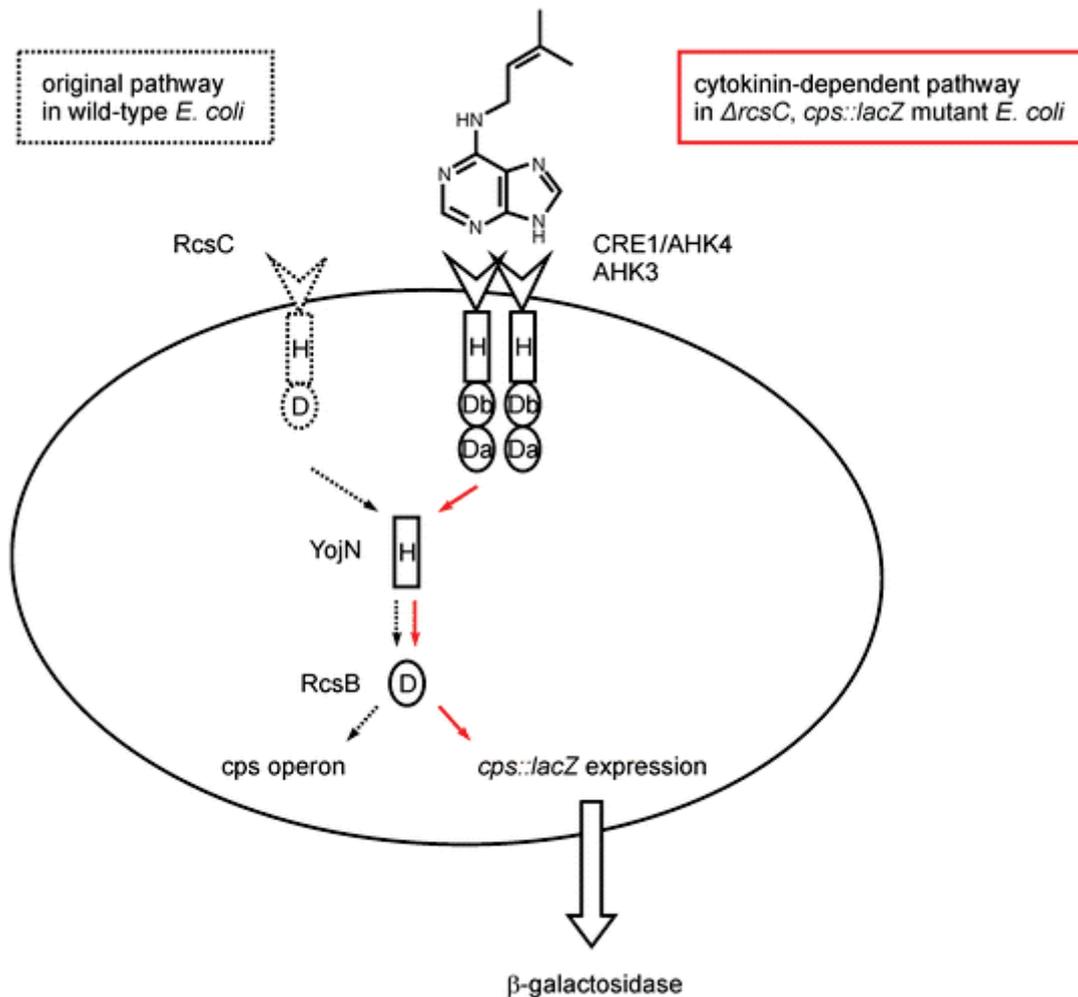


Figura 6. Bio-ensaio de detecção de citocininas em *E. coli* (cepa KMI001: $\Delta rcsC$, *cps::lacZ*) e receptores de citocininas AHK3/AHK4.

Fonte: Adaptado de SPÍCHAL, 2011.

1.6. Enzimas isopentenil transferase (IPT) de plantas e bactérias

1.6.1. Enzimas isopentenil transferase de plantas superiores

Em diversas plantas, a enzima IPT é codificada por uma família multigênica (GHOSH et al., 2018). Em *Arabidopsis thaliana*, essa família é composta por 9 genes (*ipt1-9*), nas quais 7 deles (*ipt1*, *ipt3-8*) codificam para isopentenil transferase (IPT), e os dois restantes (*ipt2* e *ipt9*) codificam para isopentenil transferase de tRNA (tRNA-IPT) (ZÜRCHER; MÜLLER, 2016). Dessas enzimas, quatro delas (IPT1, IPT3, IPT5 e IPT8) localizam-se nos

plastídeos, duas (IPT2 e IPT4) localizam-se no citosol e duas (IPT7 e IPT9) localizam-se na mitocôndria (KAMADA-NOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009). Acredita-se que as plantas necessitam de vários genes IPT devido ao seu padrão de expressão único e mecanismo regulatório, esse último associado com diferentes funções fisiológicas (GHOSH et al., 2018). As enzimas IPT possuem dois pequenos domínios catalíticos sobrepostos, enquanto as enzimas tRNA-IPT possuem um único grande domínio catalítico (Figura 7). Adicionalmente, as enzimas tRNA-IPT são significativamente maiores do que as enzimas IPT (GHOSH et al., 2018).

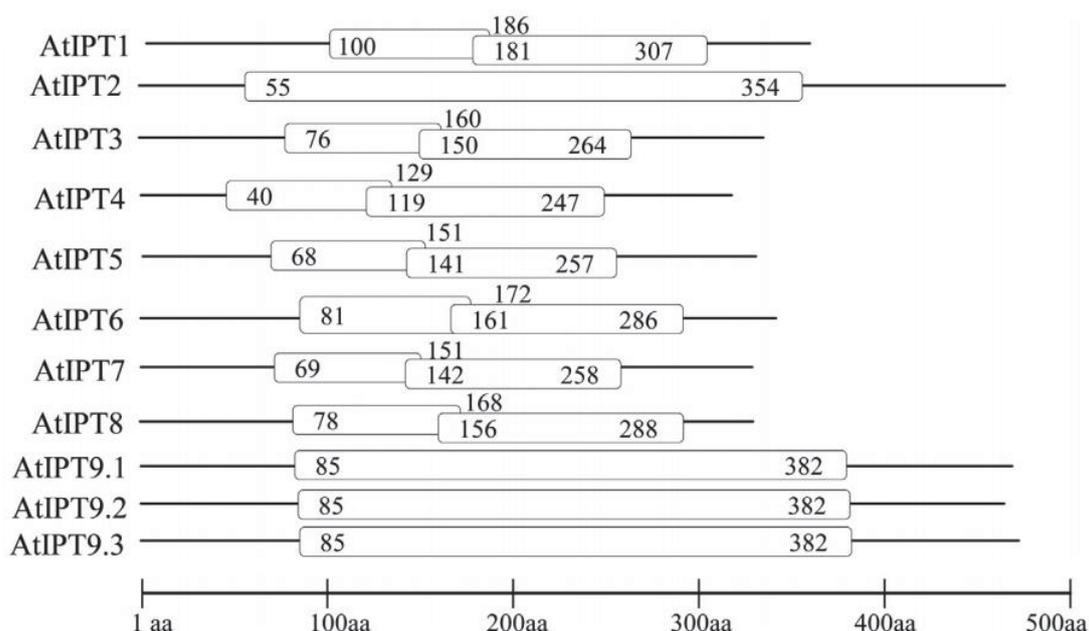


Figura 7. Representação esquemática de enzimas IPT1-9 de *Arabidopsis thaliana*.

Legenda. A linha representa toda a extensão da proteína. A caixa branca representa o domínio catalítico (IPPT) da enzima. Números representam a posição de início e término do(s) domínio(s) catalítico(s) IPPT em cada proteína. FONTE: Adaptado de GHOSH et al., 2018.

Em termos enzimáticos, as IPTs de plantas possuem preferência por DMAPP e ADP/ATP como substratos (YAMAGUCHI et al., 2010). IPTs de plantas superiores podem usar DMAPP tanto da via metileritritol fosfato (MEP, produzido nos plastídeos) quanto da via mevalonato (MVA, produzida no citosol),

embora a cadeia isoprenóide majoritariamente tenha origem da via MEP (SAKAKIBARA et al., 2005).

1.6.2. Enzimas isopentenil transferase de *Agrobacterium tumefaciens*

O plasmídeo de infecção (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* carrega genes para duas enzimas IPT (TMR e TZS). O gene *tmr* encontra-se na região de transferência (T-DNA) que é integrada ao genoma da planta hospedeira (SAKAKIBARA et al., 2005) enquanto o gene *tzs* é expresso dentro da própria bactéria (ZALABÁK et al., 2013). Apesar de IPT de plantas como *Arabidopsis thaliana* e de bactérias como *Agrobacterium tumefaciens* produzirem citocininas, existe pouca similaridade em sua estrutura primária e conseqüentemente possuem propriedades enzimáticas diferentes. TMR e TZS possuem preferência por HMBDP e AMP como substrato, produzindo *trans*-zeatina mono-fosfato (tZRMP), enquanto IPT de plantas usam DMAPP e ADP/ATP para formar isopentenil-adenina di ou tri-fosfato (iPRDP/iPRTP) como produtos de reação (SAKAKIBARA et al., 2005; SAKAKIBARA, 2006; SUGAWARA et al., 2008). De fato, a enzima TMR é direcionada para os plastídeos, organela na qual HMBDP é produzido na célula vegetal (SAKAKIBARA et al., 2005).

1.7. Mecanismo de reação das isopentenil transferases em plantas e bactérias

O mecanismo de reação das IPTs e tRNA-IPTs é conservado entre as enzimas de plantas superiores e de *Agrobacterium tumefaciens* (KAMADANOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009; CHU et al., 2010; GHOSH et al., 2018). A reação de isoprenilação do nitrogênio N⁶ de adenosina fosfato (AMP, ADP ou ATP) ocorre por meio de uma reação de substituição nucleofílica do tipo 2 (S_N2) (Figura 8). Inicialmente o grupo carboxilato de um resíduo de aspartato atua como base geral e desprotona o nitrogênio N⁶ da adenosina fosfato, e o nucleófilo resultante ataca o carbono C¹ da molécula doadora do grupo isoprenil (SUGAWARA et al., 2008). A citocinina resultante do colapso do estado de transição pentacovalente depende da molécula doadora do grupo isoprenil: o uso de DMAPP como substrato gera derivados fosforilados de isopentenil

adenosina (iPR), enquanto o uso de HMBDP gera derivados fosforilados de *trans*-zeatina ribosídeo (tZR) (KAMADA-NOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009). A enzima necessita de um metal divalente no sítio catalítico para a realização da reação. O íon metálico serve tanto para neutralizar a carga negativa do grupo fosfato da molécula receptora do grupo isoprenil, quanto para imobilizar a molécula doadora do grupo isoprenil (KAMADA-NOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009).

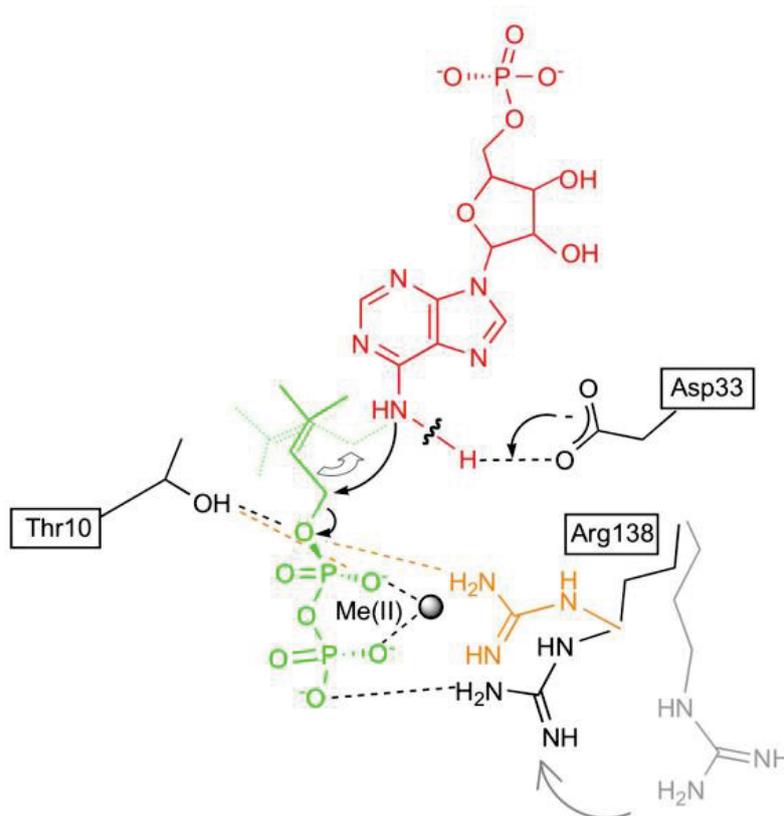


Figura 8. Mecanismo de reação de IPT e tRNA-IPT.

Legenda. Em vermelho, AMP; em verde, DMAPP. O sítio catalítico da figura pertence à enzima TZS de *Agrobacterium tumefaciens*.

FONTE: SUGAWARA et al., 2008.

1.8. Biologia Sintética

Embora não exista uma definição internacionalmente comum (SHAPIRA et al., 2017), a biologia sintética pode ser vista como “uma disciplina que combina abordagens da ciência e da engenharia para o estudo e manipulação da biologia” (NATIONAL ACADEMY OF ENGINEERING AND NATIONAL RESEARCH

COUNCIL, 2013), ou ainda como “a aplicação da ciência, tecnologia e engenharia para facilitar e acelerar o design, manufatura e/ou modificação de materiais genéticos em seres vivos” (EUROPEAN COMMISSION SCIENTIFIC COMMITTEES, 2014).

A biologia sintética teve sua origem em 2000, quando demonstrou ser possível desenvolver circuitos genéticos artificiais e funcionais (ELOWITZ; LEIBLER, 2000; GARDNER et al., 2000). A disciplina teve inicialmente ampla divulgação através da competição internacional anual de biologia sintética (International Genetically Engineered Machines – iGEM) e da BioBricks Foundation (SMOLKE, 2009), e atualmente é uma área do conhecimento que cresce a passos acelerados (SHAPIRA et al., 2017).

O impacto da biologia sintética vai além da academia. A disciplina foi abordada pela revista *The Economist*, uma das maiores revistas internacionais sobre economia, como uma tecnologia revolucionária (UCINI, 2019; WEAVER, 2019). Em 2020, empresas de biologia sintética quebraram recordes em níveis de investimentos (7,8 bilhões de dólares (US\$)) a despeito de uma pandemia global, recessão econômica e os maiores níveis de desempregos desde a Grande Depressão (WISNER, 2021). Empresas de biologia sintética atuam nas áreas de biotecnologia, farmacêutica e de agricultura, oferecendo produtos como películas plásticas para eletrônicos (Hyaline, da empresa Zyemergen), células T programadas para tratar leucemia linfóide aguda tipo B (Kymriah, da empresa Novartis), proteína heme inserida em produtos vegetarianos para imitar o gosto e a experiência de comer carne bovina (empresa Impossible Foods) ou bactérias fixadoras de nitrogênio que conseguem colonizar cereais, como milho (PROVEN, da empresa Pivot Bio) (VOIGT, 2020).

1.8.1. Montagem de circuitos genéticos sintéticos

Um dos fundamentos da biologia sintética é a criação de novos fenótipos através da construção de circuitos genéticos sintéticos (MACDONALD; DEANS, 2016). Para construir esses circuitos, aplica-se à biologia conceitos de engenharia como decomposição de funções, abstração e modularidade (SLUSARCZYK et al., 2012). Além disso, necessita-se de componentes genéticos que sejam bem caracterizados, modulares (i.e. que funcionem de

forma similar em sistemas diferentes) e sejam independentes de outros processos celulares (SPRINZAK; ELOWITZ, 2005). Na prática, implica em descobrir, otimizar e caracterizar o comportamento de partes elementares (i. e. sequências de DNA com função definida, como promotores, repressores, sítios de ligação de ribossomo, genes e terminadores), criar coletâneas dessas partes elementares, documentar essas coleções de partes genéticas e desenvolver métodos padrões de clonagem (SPRINZAK; ELOWITZ, 2005).

Existem duas formas amplamente usadas para construir circuitos genéticos: o sistema Biobricks (KNIGHT, 2003) e o sistema Golden Gate (ENGLER et al., 2008). O método de clonagem Biobricks, usado nesse trabalho, é um sistema modular que permite que insertos sejam ligados a jusante ou a montante de partes genéticas de forma direcionada a cada reação de ligação sem perder a modularidade, permitindo a montagem de circuitos genéticos de forma similar a blocos de construção (Figuras 9 e 10) (KNIGHT, 2003). Esse sistema é usado na competição iGEM (igem.org) e possui uma vasta coleção de partes genéticas (Registry of Standard Biological Parts), com informações de fácil acesso (parts.igem.org).

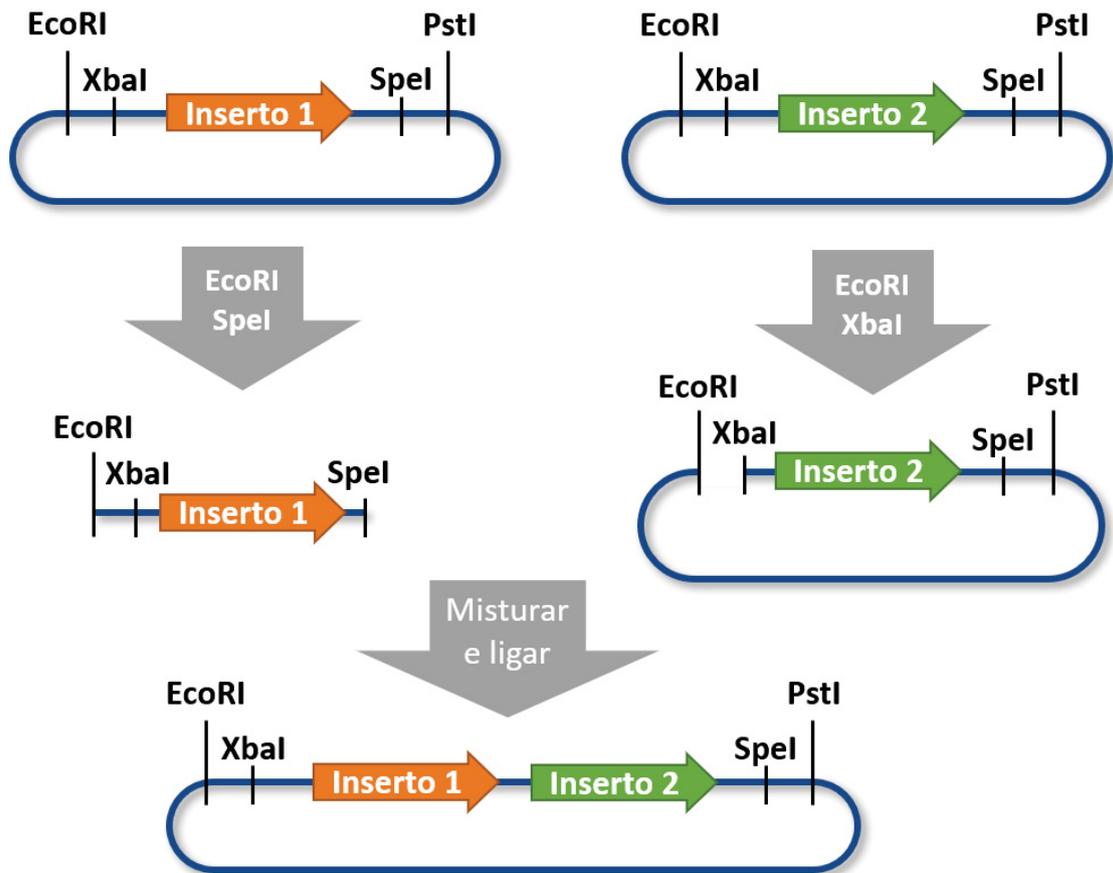


Figura 9. Clonagem *upstream* através do sistema Biobricks

Legenda. EcoRI, XbaI, SpeI, PstI: sítio de restrição para enzimas de restrição EcoRI, XbaI, SpeI e PstI, respectivamente. Inserto 1 e Inserto 2: partes genéticas.

Fonte: O Autor

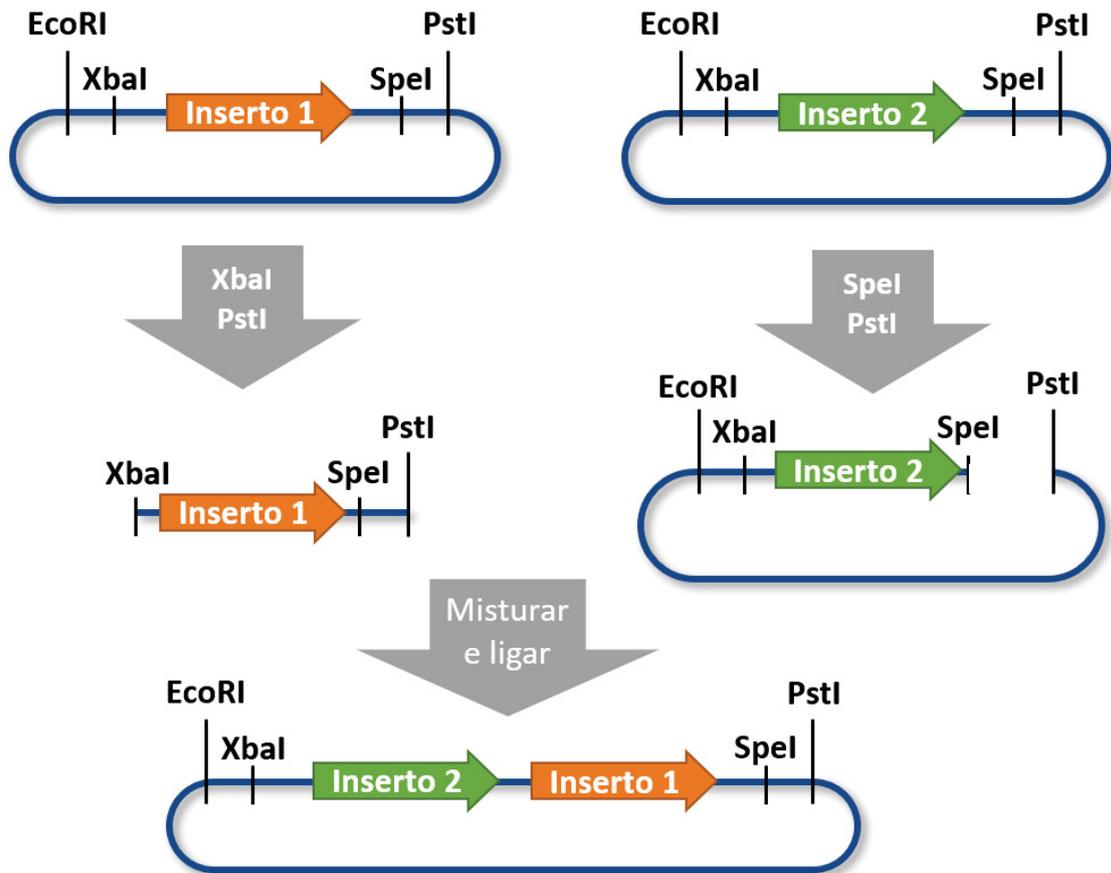


Figura 10. Clonagem *downstream* através do sistema Biobricks

Legenda. EcoRI, XbaI, SpeI, PstI: sítio de restrição para enzimas de restrição EcoRI, XbaI, SpeI e PstI, respectivamente. Inserto 1 e Inserto 2: partes genéticas.

Fonte: O Autor

1.9. Uso biotecnológico de citocininas

O maior uso comercial de citocininas é na micropropagação vegetal, na qual citocininas são rotineiramente usadas nos meios de cultivo (ZALABÁK et al., 2013; JAMESON, 2017). Uma das utilidades dessa técnica é a propagação de plantas medicinais, ornamentais e frutíferas que são difíceis de propagar por métodos convencionais, reduzindo o custo da semeadura/produção da planta ao mesmo tempo em que aumenta suas chances de sobrevivência na natureza (ZALABÁK et al., 2013; PLÍHALOVÁ et al., 2016). Citocininas também são usadas no cultivo de células e órgãos vegetais, uma vez que essas culturas não

podem ser estabelecidas e propagadas sem a presença de hormônios vegetais. Essas culturas são usadas na produção industrial de metabólitos secundários de plantas, que são usados como fármacos, agroquímicos, aromatizantes de alimentos, corantes, pesticidas e aditivos alimentares. A adição de citocininas no meio mantém o rendimento de produtos desejáveis ou melhora a produção de alguns metabólitos secundários (OSHCHEPKOV et al., 2020).

Na agroindústria, a prioridade é a maximização da produtividade e do rendimento (ZALABÁK et al., 2013). Acredita-se que exista uma relação complexa entre citocininas e produção de culturas, e o número e a massa de sementes (POWELL et al., 2013). Além disso, o controle de senescência para melhorar o rendimento e estender a vitalidade da planta e o controle à resposta ao estresse para minimizar perdas são estratégias viáveis que dependem dos níveis endógenos de citocinina (HA et al., 2012; CIURA; KRUK, 2018). Citocininas regulam positivamente a expressão de genes envolvidos na mediação da relação entre capacidade fotossintética/absorção incluindo a translocação de nutrientes para órgãos de estocagem. Portanto, controlar os níveis de citocininas em plantas pode ser uma ferramenta útil para melhorar o rendimento de grãos (ZALABÁK et al., 2013). Citocininas também controlam outros aspectos de interesse agroindustrial como captação de nutrientes essenciais (nitrogênio, fósforo, enxofre e ferro), a formação de nódulos em leguminosas e a defesa contra stress ambiental (frio, calor, seca, salinidade do solo) e contra patógenos (vírus, bactérias, fungos). Esses aspectos podem levar a um drástico aumento na sobrevivência e produtividade de plantas sob condições adversas (OSHCHEPKOV et al., 2020).

Dessa forma, uma possível abordagem biotecnológica é modificar geneticamente plantas para controlar os níveis endógenos de citocininas através do controle da biossíntese (expressão de IPT e LOG) e da degradação (supressão de CKX) do fito-hormônio (CIURA; KRUK, 2018). Em arroz, variantes com a enzima CKX defeituosa apresentaram maiores níveis endógenos de citocininas e produziram 44% mais grãos por panícula do que a variante com a enzima CKX funcional (ASHIKARI et al., 2005). De forma similar, a deleção da enzima CKX em cevada elevou a produção de grãos em 48% e o peso das sementes em 22% (ZALEWSKI et al., 2010). O uso de promotores induzíveis, específicos ao tecido alvo ou artificialmente ativados para produção condicional

de citocininas, permite o controle dos níveis desse fito-hormônio sem efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento da planta causado por desregulação hormonal (HA et al., 2012; JISKROVÁ et al., 2015; CIURA; KRUK, 2018).

Entretanto, apesar desses resultados promissores, existem alguns fatores que tornam essa abordagem inviável no momento presente: (1) a manipulação genética de plantas (especialmente monocotiledôneas) ainda enfrenta obstáculos técnicos (ZALABÁK et al., 2013); (2) o padrão de expressão e regulação espaço-temporal de citocininas e a interação com outros fito-hormônios ainda não está elucidado; (3) faz-se necessário um controle fino dos níveis endógenos de citocininas para evitar fenótipos indesejados (O'BRIEN; BENKOVÁ, 2013; CIURA; KRUK, 2018; GU et al., 2018); e (4) a resistência do público consumidor em relação ao consumo de organismos transgênicos (ZALABÁK et al., 2013).

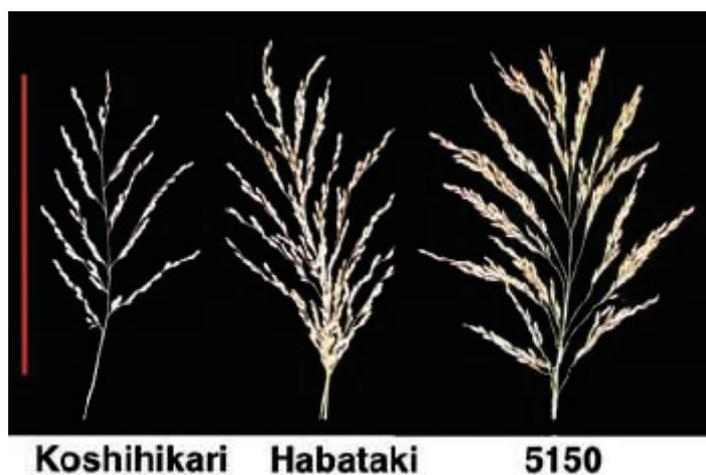


Figura 11. Produção de grãos em arroz com diferentes níveis endógenos de citocininas.

Legenda. Da esquerda para a direita: 1) variedade de arroz *indica*, Koshihikari. 2) variedade de arroz *japonica*, Habataki. 3) variedade de arroz chinesa, 5150. As variantes estão dispostas de acordo com os níveis endógenos de citocininas crescentes da esquerda para a direita.

Fonte: ASHIKARI et al., 2005.



Figura 12. Grãos de cevada com diferentes níveis endógenos de citocininas.

Legenda. Da esquerda para direita: 1) variedade selvagem, Golden Promise. 2) Cevada Golden Promise geneticamente modificada ($\Delta HvCKX1$), que apresenta conteúdo maior de citocininas.

Fonte: ZALEWSKI et al., 2010.

Outra abordagem biotecnológica é a aplicação externa de citocininas em árvores frutíferas, vegetais e plantas ornamentais para promover o crescimento em fases de desenvolvimento bem definidas da planta, para estimular a germinação e ramificação, e para melhorar a produtividade (KOPRINA et al., 2016; OSHCHEPKOV et al., 2020). A aplicação de citocininas possuem efeito local, atuando na região ao qual foram aplicadas (SMALL; DEGENHARDT, 2018). A literatura reporta experimentos de campo já realizados em cereais (trigo, cevada, arroz, milho, aveia, sorgo), legumes (soja, feijão, ervilha), hortícolas (tomate, alface, berinjela) e frutíferas (maçã, pera, kiwi), indicando que a aplicação exógena de citocininas pode aumentar o desempenho dessas plantas (para mais detalhes acerca desse trabalhos, ver as revisões feitas por KOPRINA et al., 2016 e OSHCHEPKOV et al., 2020). Por exemplo, foi demonstrado em produção de kiwi que o uso da citocinina sintética N-(2-cloro-4-piridil)-N'-feniluréia (CPPU) em flores aumentou o volume e a taxa de crescimento do fruto na média de 30% (AINALIDOU et al., 2016).

Vale observar que todos os trabalhos citados usaram citocininas sintéticas. Apesar desses compostos possuírem baixo custo de produção e serem moléculas metabolicamente estáveis e resistente à ação de enzimas de degradação CKX (OSHCHEPKOV et al., 2020), essas mesmas características as tornam poluentes ambientais em potencial. O excesso desses compostos que

não é absorvido pela lavoura pode ir para o solo devido à irrigação e/ou chuva (afetando microrganismos da rizosfera e a flora nativa circundante) e ainda entrar em corpos d'água como rios, lagos e lençóis freáticos (STIRK; STADEN, 2010). Devido à sua estabilidade e resistência à degradação, citocininas sintéticas podem se acumular na biosfera.

Uma saída para contornar esse problema é usar citocininas naturais, entretanto, o maior impeditivo atual dessa abordagem é o alto custo associado à obtenção dessas citocininas (ZALABÁK et al., 2013). A concentração de citocininas em tecidos vegetais é baixa (menos de 50 pmol/g de massa fresca; NOVÁK et al., 2003), tornando o processo de extração pouco rentável. Outro ponto a ser considerado é que a síntese química de citocininas naturais apresenta um custo alto de produção.

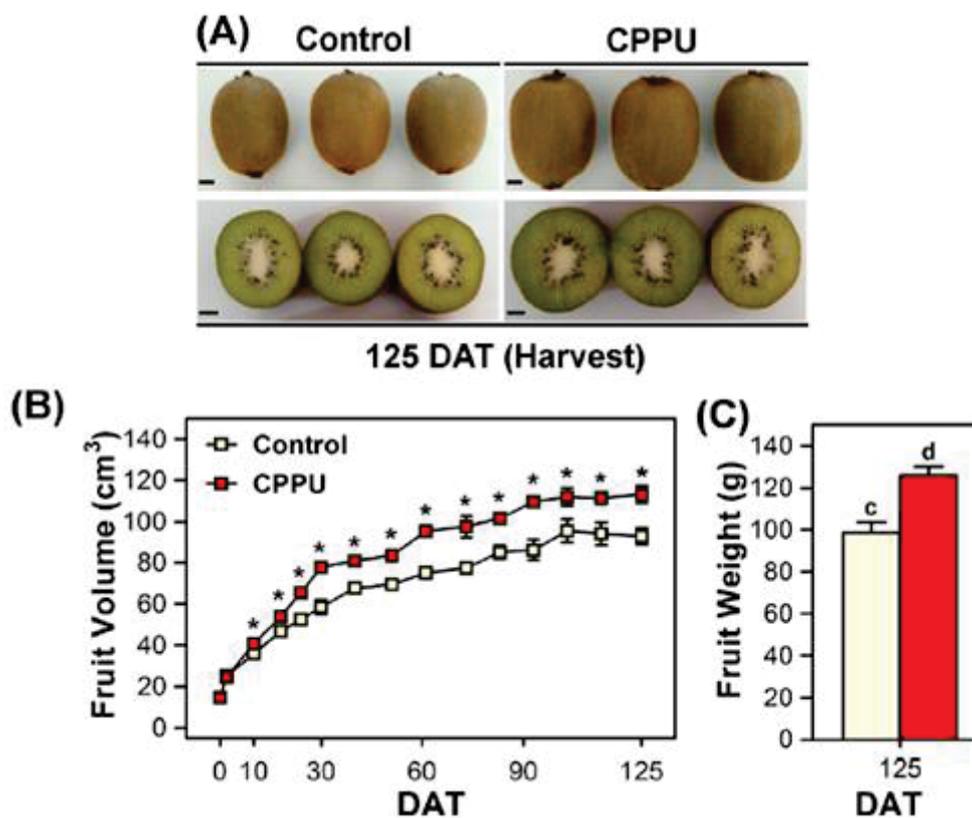


Figura 13. Efeito da aplicação de citocinina sintética (CPPU) em frutos de kiwi.

Legenda. A) Frutos sem tratamento (esquerda) e tratados com citocinina sintética CPPU (direita). Barra de escala: 1 cm. Os frutos foram fotografados na colheita, 125 dias após aplicação de CPPU. B) Volume, em cm³, de frutos sem tratamento (quadrados amarelos) e tratados com citocinina sintética CPPU

(quadrados vermelhos). C) Massa após a colheita, em gramas, de frutos sem tratamento (barra amarela) e tratados com citocinina sintética CPPU (barra vermelha). DAT, dias após tratamento com CPPU. Asterisco (*) indica diferença significativa entre amostras colhidas no mesmo período de tempo (Teste t, $p < 0,05$). Letras (c, d) indicam diferença significativa entre frutos após a colheita, 125 dias após aplicação de CPPU (teste de amplitudes múltiplas de Duncan, $p < 0,05$).

Fonte: AINALIDOU et al., 2016

Uma alternativa para reduzir o alto custo de produção de citocininas é o emprego da biologia sintética, transportando a via metabólica de biossíntese de citocininas para bactérias. Trabalhando com circuitos genéticos planejados e modelos procarióticos ou eucarióticos bem caracterizados, é possível: (1) desenvolver processos fermentativos para a produção em larga escala de citocinina em biorreatores; e (2) transformar bactérias que naturalmente promovem o crescimento de plantas em pequenas fábricas de produção de fitohormônio, para entregar esse composto diretamente *in situ* em condições induzidas pela própria planta. Até o momento em que esta Tese foi escrita, essa abordagem não foi explorada: os poucos trabalhos que envolvem a expressão heteróloga de enzimas da biossíntese de citocininas relacionam-se à descoberta da função do gene *tmr* no plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (AKIYOSHI et al., 1984; BARRY et al., 1984) e à descoberta da função da família de genes *ipt* de *Arabidopsis thaliana* (TAKEI et al., 2001), todos em linhagens da bactéria *Escherichia coli* (BNN103, W3110 e JM109). Desses trabalhos, apenas TAKEI et al., 2001 foi além de purificar a enzima e realizar ensaio enzimático *in vitro*. O autor investigou também o sobrenadante de bactérias expressando o gene *tmr* de *Agrobacterium tumefaciens* e genes IPT de *Arabidopsis thaliana*, e detectou citocininas no sobrenadante dessas bactérias (Figura 14). Tal resultado, embora não fosse o foco principal do autor, mostram que a abordagem sugerida no início desse parágrafo é viável.

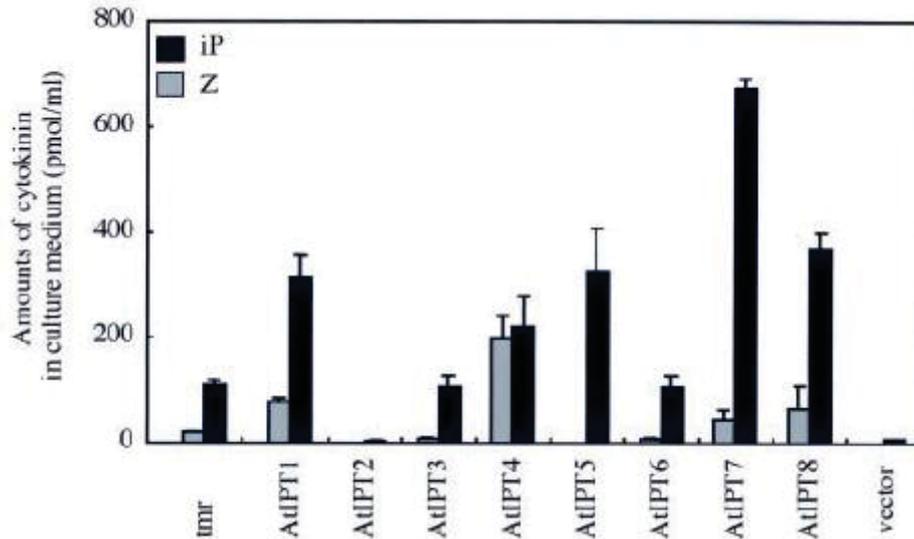


Figura 14. Ensaio ELISA de citocininas presentes no sobrenadante de *E. coli* expressando enzimas Tmr de *Agrobacterium tumefaciens* e Ipt de *Arabidopsis thaliana*.

Legenda: 1) tmr: sobrenadante de *E. coli* JM109 expressando enzima Tmr do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. 2) a 9) AtIPT1 a AtIPT8: sobrenadante de *E. coli* JM109 expressando enzimas IPT 1 a 8 de *Arabidopsis thaliana*. 10) vector: sobrenadante de *E. coli* JM109 transformada com o plasmídeo sem inserto. Barras cinza representam quantificação de zeatina (tZ ou cZ), enquanto barras pretas representam quantificação de iP.

Fonte: TAKEI et al., 2001.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver bactérias capazes de produzir citocininas através de biologia sintética, e usar o produto dessas bactérias para promover o crescimento vegetal.

2.2. Objetivos específicos

- Construir plasmídeos recombinantes contendo os genes responsáveis pela biossíntese de citocininas.
- Inserir os plasmídeos recombinantes em *Escherichia coli* MG1655 e caracterizar a produção de citocininas
- Caracterizar as enzimas responsáveis pela biossíntese de citocininas no sistema recombinante desenvolvido.
- Quantificar a produção de citocininas pelas bactérias por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e por bio-ensaios.
- Determinar a atividade biológica da citocinina produzida por bactérias recombinantes em plantas.

3. Metodologia

3.1. Técnicas de clonagem de DNA

A clonagem dos plasmídeos foi realizada através do sistema Biobricks, descrito por KNIGHT, 2003. Os genes IPT4 de *Arabidopsis thaliana* e *tmr* de *Agrobacterium tumefaciens* (sintetizados no formato Biobrick e com códons otimizados para *E. coli*) foram clonados separadamente sob controle de diferentes promotores induzíveis e constitutivos (ver Tabela 1), junto a um terminador duplo (BBa_B0015) e um sítio de ligação do ribossomo (BBa_B0034) (ver Figura 15). De forma similar, também foi construído um plasmídeo contendo gene que codifica para a proteína fluorescente mRFP1 (BBa_E1010) sob controle do promotor constitutivo J23119, visto que o plasmídeo original que contém esse promotor não possui o gene repórter mRFP1 (BBa_E1010). A construção dos plasmídeos passo-a-passo encontra-se no Anexo (Seção 9). Os plasmídeos obtidos por clonagem estão sumarizados na Tabela 2. Os demais plasmídeos usados nesse trabalho estão sumarizados na Tabela 3. Informação de todas as partes biológicas usadas nesse trabalho encontram-se disponíveis no Registry of Standard Biological Parts (parts.igem.org) e a sequência dos genes e das partes biológicas usados nesse trabalho encontram-se na Tabela 4.

Tabela 1. Promotores induzíveis e constitutivos usados para clonagem

Promotor	Descrição
K592008	Promotor induzível híbrido do fago T5 e do operon <i>lac</i> . Regulado por LacI.
R0010	Promotor induzível do operon <i>lac</i> . Regulado por LacI.
J23112	Promotor constitutivo fraco.
J23110	Promotor constitutivo forte.
J23100	Promotor constitutivo muito forte.
J23119	Promotor constitutivo muito forte*.

*J23119 é o promotor que contém as sequências consenso nos sítios -10 e -35 e é o mais forte da série de promotores constitutivos Anderson.

Fonte: Registry of Standard Biological Parts (parts.igem.org).

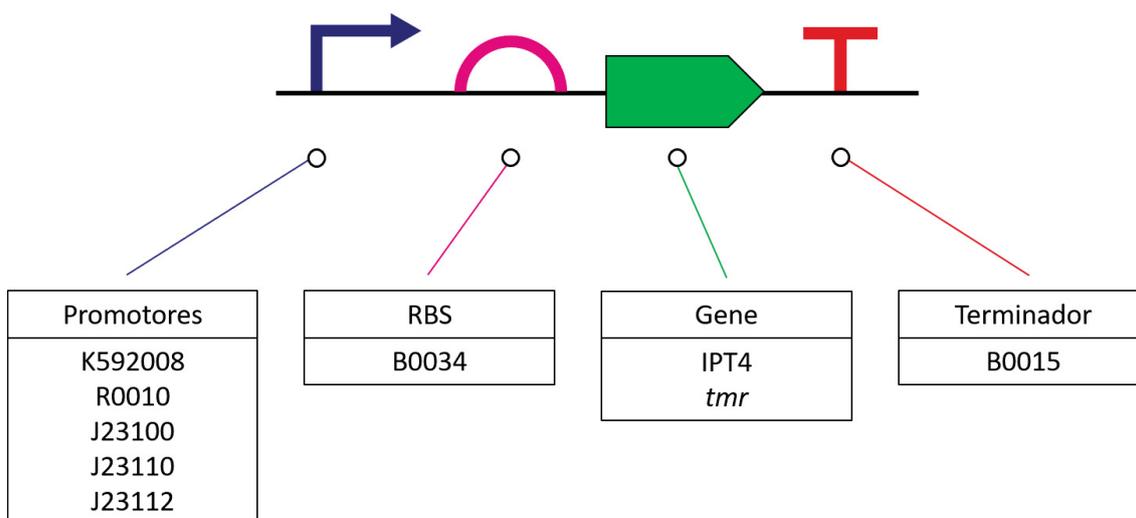


Figura 15. Configuração final das construções contendo *tmr* ou IPT4.

Tabela 2. Plasmídeos construídos nesse trabalho

Plasmídeo	Característica
pKtmr	Gene <i>tmr</i> regulado por promotor T5-Lac (K592008)
pKipt	Gene IPT4 regulado por promotor T5-Lac (K592008)
pRtmr	Gene <i>tmr</i> regulado por promotor Lac (R0010)
pRipt	Gene IPT4 regulado por promotor Lac (R0010)
pJ100tmr	Gene <i>tmr</i> regulado por promotor constitutivo muito forte (J23100)
pJ100ipt	Gene IPT4 regulado por promotor constitutivo muito forte (J23100)
pJ110tmr	Gene <i>tmr</i> regulado por promotor constitutivo forte (J23110)
pJ110ipt	Gene IPT4 regulado por promotor constitutivo forte (J23110)
pJ112tmr	Gene <i>tmr</i> regulado por promotor constitutivo fraco (J23112)
pJ112ipt	Gene IPT4 regulado por promotor constitutivo fraco (J23112)
pJ119_E1010	Gene repórter <i>mrfp1</i> (E1010*) regulado por promotor constitutivo muito forte (J23119)

*Fonte: Registry of Standard Biological Parts (parts.igem.org).

Tabela 3. Plasmídeos usados nesse trabalho

Plasmídeo	Característica
pK592008	Plasmídeo original Biobrick (BBa_K592008*). Plasmídeo vazio contendo promotor T5-Lac.
pR0010	Plasmídeo original Biobrick (BBa_R0010*). Plasmídeo vazio contendo promotor Lac.
pJ23119wt	Plasmídeo original Biobrick (BBa_J23119*). Plasmídeo vazio contendo promotor constitutivo muito forte.
pJ23100	Plasmídeo original Biobrick (BBa_J23100*). Plasmídeo contendo gene repórter <i>mrfp1</i> (E1010*) regulado por promotor constitutivo muito forte.
pJ23110	Plasmídeo original Biobrick (BBa_J23110*). Plasmídeo contendo gene repórter <i>mrfp1</i> (E1010*) regulado por promotor constitutivo forte.
pJ23112	Plasmídeo original Biobrick (BBa_J23112*). Plasmídeo contendo gene repórter <i>mrfp1</i> (E1010*) regulado por promotor constitutivo fraco.
pSTV28	Plasmídeo contendo o gene AHK3 de <i>Arabidopsis thaliana</i> regulado por promotor ppl-lac**.
pINIIIΔEH	Plasmídeo contendo o gene CRE1/AHK4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> regulado por promotor ppl-lac**.

*Fonte: Registry of Standard Biological Parts (parts.igem.org).

**Fonte: SUZUKI et al., 2001.

Tabela 4. Sequências de genes e partes genéticas usadas nesse trabalho

Gene/Parte Biológica	Sequência
<i>tmr</i>	GAATTCGCGGCCGCTTCTAGATGGACCTGCGTCT GATCTTCGGTCCGACCTGCACCGGTAAACCTCT ACCGCTGTTGCTCTGGCTCAGCAGACCGGTCTG CCGGTTCTGTCTCTGGACCGTGTTTCAGTGCTGCC CGCAGCTGTCTACCGGTTCTGGTCGTCCGACCG

	<p>TTGAAGAACTGAAAGGTACCTCTCGTCTGTACCT GGACGACCGTCCGCTGGTTAAAGGTATCATCGCT GCTAAACAGGCTCACGAACGTCTGATGGGTGAA GTTTACAACACTACGAAGCTCACGGTGGTCTGATCC TGGAAGGTGGTTCTATCTCTCTGCTGAAATGCAT GGCTCAGTCTTCTTACTGGTCTGCTGACTTCCGT TGGCACATCATCCGTCACGAACTGGCTGACGAA GAAACCTTCATGAACGTTGCTAAAGCTCGTGTTA AACAGATGCTGCGTCCGGCTGCTGGTCTGTCTAT CATCCAGGAACTGGTTGACCTGTGGAAAGAACC GCGTCTGCGTCCGATCCTGAAAGAAATCGACGG TTACCGTTACGCTATGCTGTTGCTTCTCAGAAC CAGATCACCTCTGACATGCTGCTGCAACTGGACG CTGACATGGAAGACAACTGATCCACGGTATCGC TCAGGAATACCTGATCCACGCTCGTCGTCAGGAA CAGAAATTCCCGCGTGTTAACGCTGCTGCTTACG ACGGTTTCGAAGGTCACCCGTTCCGGTATGTACTA ATAATACTAGTAGCGGCCGCTGCAG</p>
IPT4	<p>GAATTCGCGGCCGCTTCTAGATGAAATGCAACGA CAAAATGGTTGTTATCATGGGTGCTACCGGTTCT GGTAAATCTTCTCTGTCTGTTGACCTGGCTCTGC ACTTCAAAGCTGAAATCATCAACTCTGACAAAATG CAGTTCTACGACGGTCTGAAAATCACCACCAACC AGTCTACCATCGAAGACCGTCGTGGTGTTCGCA CCACCTGCTGGGTGAACTGAACCCGGAAGCTGG TGAAGTTACCGCTGCTGAATTCGTGTTATGGCT GCTGAAGCTATCTCTGAAATCACCCAGCGTAAAA AACTGCCGATCCTGGCTGGTGGTTCTAACTCTTA CATCCACGCTCTGCTGGCTAAATCTTACGACCCG GAAAACCTACCCGTTCTCTGACCACAAAGGTTCTA TCTGCTCTGAACTGAAATACGACTGCTGCTTCAT CTGGATCGACGTTGACCAGTCTGTTCTGTTGAA TACCTGTCTCTGCGTCTGGACCTGATGATGAAAT</p>

	<p>CTGGTATGTTCGAAGAAATCGCTGAATTTACCCG TTCTAAAAAAGCTCCGAAAGAACCGCTGGGTATC TGGAAAGCTATCGGTGTTGAGGAATTTGACGACT ACCTGAAAATGTACAAATGGGACAACGACATGGA CAAATGGGACCCGATGCGTAAAGAAGCTTACGAA AAAGCTGTTTCGTGCTATCAAAGAAAACACCTTCC AGCTGACCAAAGACCAGATCACCAAATCAACAA ACTGCGTAACGCTGGTTGGGACATCAAAAAAGTT GACGCTACCGCTTCTTTCCGTGAAGCTATCCGTG CTGCTAAAGAAGGTGAAGGTGTTGCTGAAATGCA GCGTAAAATCTGGAACAAAGAAGTTCTGGAACCG TGC GTTAAAATCGTTTCGTTCTCACCTGGACCAGC CGATCAACTACTACTACTACTTCTACCTGCTG AAACGTTTCCTGTCTCTGAACTAATAACTAGTA GCGGCCGCTGCAG</p>
E1010	<p>GAATTCGCGGCCGCTTAGATGGCTTCCTCCGA AGACGTTATCAAAGAGTTCATGCGTTTCAAAGTTC GTATGGAAGGTTCCGTTAACGGTCACGAGTTCGA AATCGAAGGTGAAGGTGAAGGTCGTCCGTACGA AGGTACCCAGACCGCTAAACTGAAAGTTACCAA GGTGGTCCGCTGCCGTTTCGCTTGGGACATCCTG TCCCCGCAGTTCCAGTACGGTTCCAAAGCTTACG TTAAACACCCGGCTGACATCCCGGACTACCTGAA ACTGTCCTTCCCGGAAGGTTTCAAATGGGAACGT GTTATGAACTTCGAAGACGGTGGTGTGTTACCG TTACCCAGGACTCCTCCCTGCAAGACGGTGAGTT CATCTACAAAGTTAAACTGCGTGGTACCAACTTC CCGTCCGACGGTCCGGTTATGCAGAAAAAACCA TGGGTTGGGAAGCTTCCACCGAACGTATGTACCC GGAAGACGGTGCTCTGAAAGGTGAAATCAAATG CGTCTGAAACTGAAAGACGGTGGTCACTACGAC GCTGAAGTTAAAACCACCTACATGGCTAAAAAC CGGTTTCAGCTGCCGGGTGCTTACAAAACCGACAT</p>

	<p>CAAAC TGGACATCACCTCCCACAACGAAGACTAC ACCATCGTTGAACAGTACGAACGTGCTGAAGGTC GTCACTCCACCGGTGCTTAATAACGCTGATAGTG CTAGTGTAGATCGCTAATACTAGTAGCGGCCGCT GCAG</p>
K592008	<p>GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGATGTGG AATTGTGAGCGGATAACAATTACGAGCTTCATGC ACAGTGAAATCATGAAAAATTTATTTGCTTTGTGA GCGGATAACAATTATAATATGTGGAATTGTGAGC GCTCACAATTCCACAACGTACTAGTAGCGGCCGCGC TGCAGGAAGAAAC</p>
R0010	<p>GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCAAT ACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGAT TCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGAC TGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAAT GTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTT TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACATACTAGT AGCGGCCGCTGCAGGAAGAAAC</p>
J23100	<p>GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTGA CGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCTAC TAGTAGCGGCCGCTGCAGGAAGAAAC</p>
J23110	<p>GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTTA CGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAATGCTAGCTAC TAGTAGCGGCCGCTGCAGGAAGAAAC</p>
J23112	<p>GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCTGA TAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTATGCTAGCTAC TAGTAGCGGCCGCTGCAGGAAGAAAC</p>
J23119	<p>GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTGA CAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCTAC TAGTAGCGGCCGCTGCAGGAAGAAAC</p>

B0034	GTTTCTTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGAAAG AGGAGAAATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGGAAG AAAC
B0015	GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCCAGGCATCAA ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCT TTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTGAACGCTCTC TACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGG CCTTTCTGCGTTTATACTAGTAGCGGCCGCTG CAG

Legenda. 1) Azul: Prefixo Biobrick. 2) Roxo: Sufixo Biobrick. 3) Preto: Parte codificante.

Os plasmídeos construídos nesse trabalho foram confirmados através de sequenciamento (ver Seção 3.3). As reações de clivagem de DNA (enzimas EcoRI, XbaI, SpeI e PstI) e ligação de DNA (enzima T4 DNA Ligase) foram realizadas de acordo com as normas do fabricante (ThermoFisher Scientific). A purificação de DNA contidas em bandas de agarose foi realizada através de kit comercial Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Life Sciences).

3.1.1. Bactérias usadas no trabalho

As estirpes de *Escherichia coli* usadas nesse trabalho encontram-se na Tabela 5. *E. coli* TOP10 foi usada para clonagem, manutenção e propagação dos plasmídeos. *E. coli* MG1655 foi usada para ensaios de produção de citocininas e foi escolhida devido à sua robustez – é a estirpe não-patogênica mais próxima da estirpe selvagem K-12. *E. coli* KMI001 foi usada para os bio-ensaios de detecção de citocininas.

Tabela 5. Estirpes de *E. coli* usadas nesse trabalho

Estirpe	Característica	Fonte
MG1655	K-12 F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG</i> ⁻ <i>rfb-50 rph-1</i>	BLATTNER et al., 1997
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 nupG recA1</i>	Invitrogen Inc.

	<i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	
KMI001	<i>thi ara</i> Δ(<i>pro-lac</i>) Δ <i>rscC cps::lacZ</i>	SUZUKI et al., 2001

3.1.2. Propagação e manutenção de bactérias

Para propagar plasmídeos, *E. coli* TOP10 portando os plasmídeos de interesse foi cultivada em meio Lysogenic Broth (LB) (SAMBROOK et al., 1989; ver Tabela 6) contendo antibiótico como marcador de seleção a 37°C e agitação orbital de 120 rpm durante 16h. Estoque de *E. coli* TOP10 transformadas com plasmídeo de interesse foi realizado centrifugando 1,5 mL de cultivos bacterianos por 30s, seguido de descarte do sobrenadante, adição de 1 mL de solução de glicerol 50% e armazenamento em congelador a -20°C.

Tabela 6. Composição do meio Lysogenic Broth (LB)

Composto	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Fonte: SAMBROOK et al., 1989.

3.1.3. Extração e manutenção de plasmídeos

A extração de DNA plasmidial de cultivos de *E. coli* TOP10 foi realizada através de método de mini-preparação por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2000). Para armazenamento, os plasmídeos extraídos foram congelados a -20°C.

3.1.4. Transformação de plasmídeos em bactéria

Células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10, MG1655 e KMI001 foram preparadas através do método de cloreto de cálcio (CHAN et al., 2013). Transformação de plasmídeos em bactérias quimiocompetentes foi realizado

através de choque térmico (MULHARDT, 2007): bactérias quimiocompetentes foram inicialmente incubadas com DNA de interesse (1 µL para plasmídeos a serem propagados, 10 µL para reações de ligação) em gelo por 30 min. Dado esse tempo, as bactérias foram incubadas em banho maria a 42°C por 1 min e 30 s, e em seguida incubadas em gelo por 2 min. Na sequência, foi adicionado 900 µL de meio LB e as bactérias foram incubadas em estufa a 37°C por 1 h. Dado esse período, as bactérias foram plaqueadas em meio Lysogenic Broth contendo ágar 1,5% (LA) e incubadas *overnight* em estufa a 37°C.

3.2. Mutagênese sítio-dirigida dos genes *tmr* e IPT4

A mutagênese sítio-dirigida de quatro plasmídeos (pRtmr, pRipt, pJ100tmr e pJ100ipt) para inativar o sítio ativo (através da substituição de um resíduo de aspartato por um resíduo de alanina, localizado na posição 33 para o gene *tmr* e 37 para o gene IPT4) foi realizado através de PCR (ver Tabelas 7 e 8), usando primers *tmr_D::A_Fw* e *tmr_D::A_Rev* (para o gene *tmr*) e *ipt_D::A_Fw* e *ipt_D::A_Rev* (para o gene IPT4). O produto da PCR foi digerido com enzima DpnI para remoção do DNA parental de acordo com as normas do fabricante (ThermoFisher Scientific) e transformado em *E. coli* TOP10. Os plasmídeos resultantes desse processo encontram-se na Tabela 9. A sequência dos plasmídeos usados na PCR de mutagênese sítio dirigida se encontram na Tabela 10. A escolha do resíduo de aspartato a ser substituído por um resíduo de alanina para inativar o sítio catalítico das enzimas Tmr e Ipt4 foi realizado através de ferramentas de bioinformática (ver Seção 3.8).

Tabela 7. Reação de PCR para mutagênese sítio-dirigida

Composto	<i>tmr</i>	IPT4
Buffer XF*** (10x)	2 µL	2 µL
MgCl ₂ 25 mM	2 µL	2 µL
dNTP 25mM	0,8 µL	0,8 µL
Plasmídeo*	1 µL	1 µL
Primer (Fw)**	1,3 µL	1,1 µL

Primer (Rev)**	1,3 µL	1,1 µL
DNA Polimerase (Pfu)	0,5 µL	0,5 µL
Água ultrapura	11,1 µL	11,5 µL

Legenda. Asterisco simples (*): Plasmídeo foi usado sem diluição, diluído 5 vezes ou 10 vezes; idealmente a concentração final do plasmídeo deve estar ao redor de 20 ng/ µL. Asteriscos duplos (**): o valor de massa final do primer foi igual a 125 ng. Asteriscos triplos (***) : ver composição no Anexo 9.2.

Tabela 8. Parâmetros utilizados para PCR de mutagênese sítio-dirigida

Etapa (número de ciclos)	Programação
<i>Stage 1</i> (1x)	95°C, 30 min
<i>Stage 2</i> (x30)	95°C, 30 s 60/65/70°C, 1 min 72°C, 4 min
<i>Stage 3</i> (x1)	68°C, 7 min
<i>Hold</i>	4°C

Tabela 9. Plasmídeos obtidos através de PCR de mutagênese sítio-dirigida

Plasmídeo	Característica
pRt _{tmr} _D33A	Gene <i>tmr</i> mutante (expressa a proteína Tmr com a mutação D33A localizada no sítio ativo) regulado por promotor induzível Lac (R0010).
pRipt_D37A	Gene IPT4 mutante (expressa a proteína Ipt4 com a mutação D37A localizada no sítio ativo) regulado por promotor induzível Lac (R0010).
pJ100 _{tmr} _D33A	Gene <i>tmr</i> mutante (expressa a proteína Tmr com a mutação D33A localizada no sítio ativo) regulado por promotor constitutivo muito forte (J23100).
pJ100 _{ipt} _D37A	Gene IPT4 mutante (expressa a proteína Ipt4 com a mutação D37A localizada no sítio ativo) regulado por promotor constitutivo muito forte (J23100).

3.3. Sequenciamento de DNA

Todos os insertos foram confirmados por sequenciamento através de kit comercial Big Dye 3.1 (ThermoFisher Scientific) segundo normas do fabricante e usando primers VF2 e VR como molde (ver Tabela 10). A reação de PCR foi realizada conforme as Tabelas 11 e 12; após a reação, adicionou-se 10 µL de água, 2 µL de acetato de potássio 5M e 60 µL de etanol absoluto. A reação foi incubada a -80°C durante 1 hora. Dado esse tempo, a solução foi centrifugada a 13.400 rpm por 15 min. O sobrenadante foi então descartado, o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 13.400 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o microtubo foi secado em vácuo e levado para análise. A análise foi realizada por sequenciador 3500xL da Applied Biosystems.

Tabela 10. *Primers* usados nesse trabalho

Primer	Sequência
VF2	TGCCACCTGACGTCTAAGAA
VR	ATTACCGCCTTTGAGTGAGC
tmr_D::A_Fw	CGGTTCTGTCTCTGGCTCGTGTTTCAGTGCTGC
tmr_D::A_Rev	GCAGCACTGAACACGCGCCAGAGACAGAACCG
ipt4_D::A_Fw	GCTGAAATCATCAACTCTGCGAAAATGCAGTTCTACG
ipt4_D::A_Rev	CGTAGAACTGCATTTTCGCAGAGTTGATGATTTTCAGC

Tabela 11. Reação de PCR para sequenciamento

Componente	Quantidade
Plasmídeo*	3 µL
Safe Money**	2 µL
Big Dye**	0,8 µL
Primer (Fw ou Rev) 10 pmol/µL	1,2 µL
Água	3 µL

Legenda. Asterisco simples (*): o valor de massa final do plasmídeo é igual a 750 ng. Asteriscos duplos (**): Fabricante – ThermoFisher Scientific.

Tabela 12. Parâmetros utilizados para PCR de sequenciamento

Etapa	Programação
<i>Stage 1 (1x)</i>	96°C, 1 min
<i>Stage 2 (35x)</i>	96°C, 15 s 60°C, 5 min
<i>Hold</i>	4°C

3.4. Cultivo de *E. coli* para produção de citocininas

Cultivos de *E. coli* MG1655 recombinante foram realizados em meio M9-glicerol 0,4% (m/v) suplementado com 1% de casaminoácidos (m/v) e tiamina a 5 µg/mL (adaptado de TAKEI et al., 2001; ver Tabela 13) ou meio LB. Os cultivos foram realizados em frasco de vidro de 60 mL contendo 10 mL de meio ou em Erlenmeyer de 500 mL usando 100 mL de meio. Os parâmetros usados no cultivo foram 5% de taxa de inóculo, 30°C, 120 rpm de agitação orbital e 24h de cultivo. Quando necessário, os cultivos foram induzidos com IPTG (concentração final de 0,5 mM) quando a D.O.₆₀₀ do cultivo atingiu o valor de 0,4. Ao final do cultivo todas as culturas foram centrifugadas a 4°C e 4.500 x g por 10 min. O sobrenadante de cada cultivo foi congelado e armazenado a -20°C para posterior uso em bio-ensaios e para extração. O pellet de células foi lavado com 0,1 volume de cultivo de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 na presença ou ausência de 150 mM NaCl. A lise celular foi feita por sonicação usando o mesmo tampão de lavagem. A sonicação foi realizada em 10 ciclos de 15 s intercalados por 15 s de repouso em gelo. Após lise, o extrato bruto foi centrifugado (4°C, 20.000 x g, 20 min) e a fração solúvel foi utilizada para bio-ensaio e extração.

A cinética de produção de citocininas foi realizada em Erlenmeyers de 1L com 200 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL, com e sem adição de adenina 1 g/L, a 5% de taxa de inóculo, 30°C e 120 rpm. Para amostragem, 15 mL de meio foram coletados a cada intervalo de tempo e essas amostras foram processadas como descrito no parágrafo anterior.

Tabela 13. Composição do meio M9 suplementado

Composto	Concentração
Na ₂ HPO ₄	33,7 mM
KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	8,55 mM
NH ₄ Cl	9,35 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	0,3 mM
Glicerol	0,4% (v/v)
Tiamina	5 µg/mL
Casaminoácidos	1% (m/v)

Fonte: MILLER, 1972; TAKEI et al., 2001.

3.5. Extração de citocininas

A extração de citocininas do sobrenadante do meio de cultura ou do extrato celular foi realizada segundo protocolo descrito em HUSSAIN et al., 2017. O pH da amostra foi neutralizado para pH 7,0-7,5 com solução NaOH 25% (m/v), e a extração foi realizada três vezes com adição de 0,5 volume de n-butanol saturado com água. As frações orgânicas foram unificadas e evaporadas em rota-evaporador para eliminação da fase butanólica, e o resíduo foi solubilizado em 200 µL de metanol.

3.6. Bio-ensaio para detecção de citocininas

O bio-ensaio de detecção de citocininas protocolado por SPÍCHAL, 2011 foi adaptado para as condições do laboratório. A bactéria sensora *E. coli* KMI001 e os plasmídeos pINIIIΔEH (receptor CRE1/AHK4) e pSTV28 (receptor AHK3) foram cedidos por Lucáš Spíchal, da Palacký University, República Tcheca. *E. coli* KMI001 transformada com os plasmídeos pINIIIΔEH ou pSTV28 foram cultivadas em 3 mL de meio M9-glucose 0,4% suplementado com 0,1% de caseína hidrolisada (ver Tabela 14; MILLER, 1972; SPÍCHAL, 2011) a 5 µL de inóculo, amostra a ser analisada (15µL para padrões, extratos butanólicos ou

amostras diluídas 2.000x, e 600µL para amostras frescas de sobrenadante), 25°C e 120 rpm durante 16h. Controles negativo (sem adição de amostra) e positivo (adição de padrão 200µM de tZR ou iP; concentração final do padrão igual a 1 µM) também foram realizados em todos os ensaios. Para amostras de citosol o ensaio foi miniaturizado, cultivando *E. coli* KMI001 pINIILΔEH em 1 mL de M9-glucose 0,4% suplementado com 0,1% de caseína hidrolisada a 1,7 µL de inóculo e 200 µL de amostra. Controle negativo (sem adição de amostra) e positivo (adição de 5 µL de padrão 200 µM de tZR ou iP; concentração final de padrão igual a 1 µM) também foram realizados em todos os ensaios. Em ambos os casos, o ensaio de atividade de β-galactosidase dos cultivos foi realizado conforme protocolo descrito por MILLER, 1972. A estimativa de concentração de citocininas de uma dada amostra (em µM) em relação a um dado padrão (tZR ou iP) foi calculada pela fórmula abaixo:

$$\frac{A_{amostra}}{A_{padrão}} \times D$$

Na qual $A_{amostra}$ é o valor de atividade β-galactosidase da amostra (em unidades Miller), $A_{padrão}$ é valor de atividade β-galactosidase do padrão de referência (em unidades Miller), e D é o valor de diluição da amostra.

Tabela 14. Composição do meio M9.

Composto	Concentração
Na ₂ HPO ₄	33,7 mM
KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	8,55 mM
NH ₄ Cl	9,35 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	0,3 mM
Glicose	0,4% (m/v)
Caseína hidrolisada	0,1% (m/v)

Fonte: MILLER, 1972; SPÍCHAL, 2011.

3.7. Análise de citocininas por Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)

A análise das amostras por LC-MS foi adaptada de protocolo descrito por NOVÁK et al., 2017. As condições de operação da coluna de fase reversa C18 (Kinetex, 2,6 µm, 100A, 50 x 2,1 mm) foram: fluxo de 0,2 mL/min; injeção de 2 µL de amostra; tempo de corrida de 15 min; gradiente de solução de formiato de amônio a 15 mM e ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B): 0 min, 90:10 (A/B); 9 min, 10:90 (A/B); 11 min, 0:100 (A/B); 12,5 min 90:10 (A/B). O equipamento foi calibrado com solução de formiato de sódio. Soluções 1000 ng/mL de trans-zeatina (tZ), trans-zeatina ribosídeo (tZR), trans-zeatina ribosídeo monofosfato (tZRMP) e isopentenil adenina ribosídeo monofosfato (iPRMP) e 100 ng/mL de isopentenil adenina (iP) foram usados como padrão. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo UFLC Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado a um espectrômetro híbrido quadrupolo-ToF micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, EUA). As condições de operação do equipamento foram: modo positivo, voltagem do capilar 4.500V; pressão de gás de nebulização 12 bar; vazão de gás secante 6 L/min; temperatura de secagem 180°C; temperatura da coluna 45°C; temperatura do gerenciador de amostra 10°C.

Para realização da análise as amostras foram filtradas em filtro de polietersulfona (PES) de 0,22 µm, evaporadas e ressuspendidas em 200 µL de metanol.

3.8. Análise de proteínas através de ferramentas de bioinformática

A localização do resíduo de aspartato responsável pela reação enzimática de isoprenilação da adenosina fosfato foi realizado através da ferramenta BioEdit. A sequência de aminoácidos da enzima Tmr foi alinhada com a sequência da enzima Tzs de *Agrobacterium tumefaciens* (cujo resíduo catalítico é Asp-33; SUGAWARA et al., 2008; KAMADA-NOBUSADA; SAKAKIBARA, 2009) e a sequência de aminoácidos da enzima Ipt4 foi pareada com a sequência da enzima HI-Ipt de *Humulus lupulus* (cujo resíduo catalítico é Asp-62; CHU et al., 2010). As enzimas também foram pareadas com a região consenso do sítio catalítico (EVINSDKIQ; GHOSH et al., 2018) para confirmar a região catalítica.

A sequência de aminoácidos das enzimas Tzs e HI-lpt foram obtidas no banco de dados Uniprot.

A análise de homologia entre proteínas transportadoras de purinas de *Arabidopsis thaliana*, *Azospirillum brasilense* e *Escherichia coli* foram realizadas através da ferramenta Protein Blast do banco de dados NCBI. A sequência de aminoácidos das proteínas ABCG14, AtPup1, AtPup2, NupC e NupG foram obtidos no banco de dados UniProt. A análise de domínios proteicos foi realizada através da ferramenta Pfam.

3.9. Caracterização da força de transcrição dos promotores da família Anderson

Inóculos de *E. coli* MG1655 expressando proteína fluorescente mRFP1 sob controle de promotores constitutivos Anderson (pJ23100, pJ23110, pJ23112 e pJ119_E1010) foram cultivadas em 3 mL de meio M9-glicerol 0,4% (m/v) suplementado com 1% de casaminoácidos (m/v) e tiamina a 5 µg/mL a 30°C, 120 rpm e 24h de cultivo. As culturas foram então centrifugadas a 4.500 x g por 2 min, lavadas em meio de cultivo novo, centrifugadas novamente a 4.500 x g por 2 min, ressuspensas em meio de cultivo novo e inoculadas em frascos de vidro de 60 mL contendo 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% (m/v) suplementado com 1% de casaminoácidos (m/v) e tiamina a 5 µg/mL, de forma que a D.O.₆₀₀ inicial dos cultivos fosse 0,1. As bactérias foram então cultivadas a 30°C e 120 RPM. Alíquotas de 200 µL foram retiradas a cada 1h para análise de D.O.₆₀₀ e fluorescência vermelha. A força de promoção foi dada pela fluorescência relativa, definida como a taxa de fluorescência gerada pela proteína fluorescente mRFP1 em razão da taxa de variação da D.O.₆₀₀ da bactéria.

3.10. Teste biológico de citocininas em plantas

Testes biológicos em plantas utilizando citocininas produzidas por bactérias MG1655 recombinantes pKtmr e pKipt foram realizadas em parceria com o Departamento de Ciências Biomoleculares da Universidade de São Paulo (USP), localizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

(FCFRP-USP). Os experimentos foram realizados pela aluna Silvana Naomi Nagahama, sob orientação da Professora Dr^a. Carem Gledes Vargas Rechia.

Nesse experimento foram usadas linhagem de células de *Solanum lycopersicum* estabelecida pelo Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP. Um grama de massa celular foi transferida para frascos contendo 30mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962; ver Tabela 15) em pH 5,8 acrescido de sacarose 30 g/L, Phytigel 0,2%, ácido indolacético (AIA) 1,14 μ M (0,2 μ g/mL) e citocinina na forma de benzilaminopurina (BAP) 1 μ M (2,25 μ g/mL) ou 2,25 μ g/mL de biomassa liofilizada de *E. coli* MG1655 (selvagem, pKtmr, pKipt). Os cultivos foram mantidos em sala de cultura de células com fotoperíodo de 16h, 25°C e 25% de umidade relativa. Foram utilizadas 10 culturas por tratamento. Após 20 dias de cultivo, as células foram repicadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram realizados 6 subculturas por tratamento.

Tabela 15. Composição do Meio MS

Composto	Concentração
NH ₄ NO ₃	1.650 mg/L
CaCl ₂	332,2 mg/L
MgSO ₄	180,7 mg/L
KH ₂ PO ₄	170 mg/L
KNO ₃	1.900 mg/L
H ₃ BO ₃	6,2 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9 mg/L
KI	0,83 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg/L
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	37,26 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/L
<i>mio</i> -Inositol	100 mg/L
Ácido nicotínico	0,5 mg/L

Piridoxina.HCl	0,5 mg/L
Tiamina.HCl	0,1 mg/L
Glicina	2 mg/L

Fonte: MURASHIGE; SKOOG, 1962.

3.11. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de programa SigmaPlot 11.0, da Systat Software. Para analisar a variância entre múltiplos grupos (one way ANOVA) utilizou-se o método de Holm-Sidak, usando margem de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). Para comparar a média de dois grupos, utilizou-se o teste t de Student, com margem de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). Análises cujo valor-p foi inferior a 5% ($p < 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas.

4. Resultados e Discussão

Essa seção da Tese está organizada em 5 partes:

Na primeira parte (Seção 4.1) será demonstrada a funcionalidade do bio-ensaio de detecção de citocininas empregado neste trabalho.

Na segunda parte (que engloba as Seções 4.2 e 4.3) será mostrado a funcionalidade e o comportamento básico do sistema de produção de citocininas construído nessa Tese (produção extracelular e comportamento ao longo do tempo).

Na terceira parte (que engloba as Seções 4.4 e 4.5) será apresentado como o sistema de produção de citocininas se comporta perante promotores de transcrição que possuem propriedades distintas.

Na quarta parte (Seção 4.6) será demonstrado como enzimas da bactéria hospedeira do sistema de produção de citocininas podem interagir com o produto da reação enzimática das enzimas Tmr e Ipt4, e serão apresentadas hipóteses que explicam os fenômenos observados na segunda e terceira parte dessa Tese.

Na quinta parte (Seção 4.7) será apresentado a funcionalidade de um dos produtos do sistema de produção de citocininas, através da formação de calo de células de tomate (*Solanum lycopersicum*).

4.1. Validação do bio-ensaio para detecção de citocininas

O sistema de detecção de citocininas, cuja metodologia foi descrita por SPÍCHAL, 2011, foi adaptado e validado para as condições do nosso laboratório. O sistema é composto por uma bactéria sensora (*E. coli* KMI001; $\Delta rcsC$, *cps::lacZ*) expressando os receptores de citocininas de *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 ou AHK3 e utiliza a expressão do gene repórter *lacZ* sob controle do promotor *cps* em resposta a citocininas (veja Figura 6; SPÍCHAL, 2011). O sistema foi testado com curvas de concentração usando *trans*-zeatina ribosídeo (tZR) entre concentrações de 0,1 a 10 μ M. Esses valores são descritos por SPÍCHAL et al., (2004) como correspondentes às concentrações fisiológicas em plantas e da possível saturação do sistema, respectivamente.

O resultado do ensaio usando os receptores CRE1/AKH4 e AHK3 encontra-se nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Observou-se que o sistema

funciona de forma linear até a concentração de 1 μM para ambos os receptores, de forma semelhante ao observado por SPÍCHAL et al., 2004 para *trans*-zeatina (tZ) e isopentenil-adenina (iP). Para concentrações de tZR acima de 1 μM , o sistema se comportou de forma hiperbólica para o caso do receptor CRE1/AHK4 (Figura 16). Em contraste, para o receptor AHK3 houve uma saturação do sistema para concentrações a partir de 1 μM , na qual o sinal permaneceu praticamente constante (Figura 17). Apesar de SPÍCHAL et al., 2004 não ter investigado o efeito de diferentes concentrações de nucleosídeos além de 1 μM , o autor comenta que tal comportamento que observamos é previsto e que a concentração saturante do sistema ocorre acima de 1 μM , dependendo do receptor utilizado e da molécula ao qual o receptor é exposto. Com tais resultados, constatou-se que o sistema de detecção de citocininas funcionou nas condições experimentais empregadas nesse trabalho e poderia ser utilizada na continuação do mesmo.

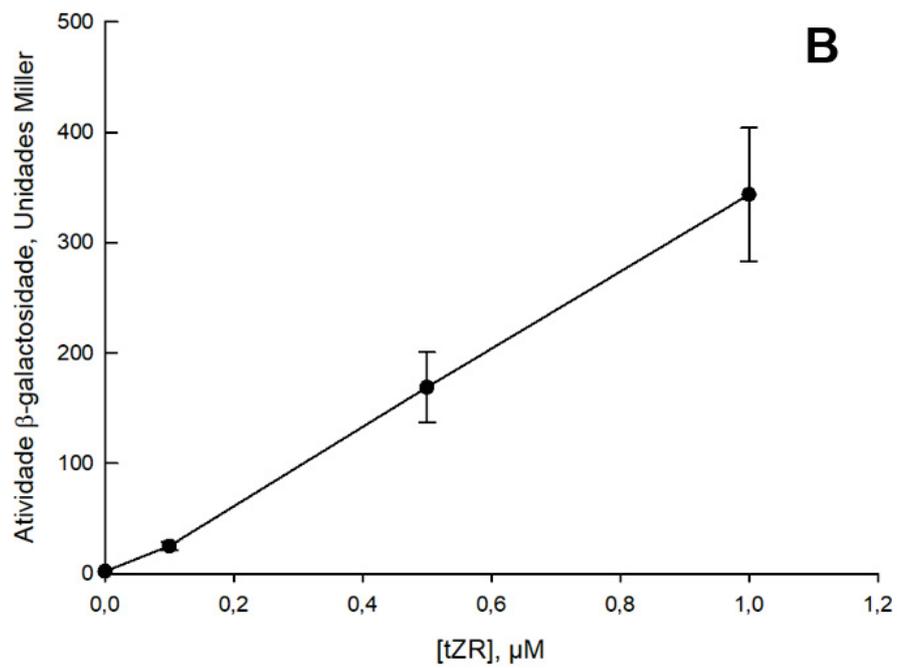
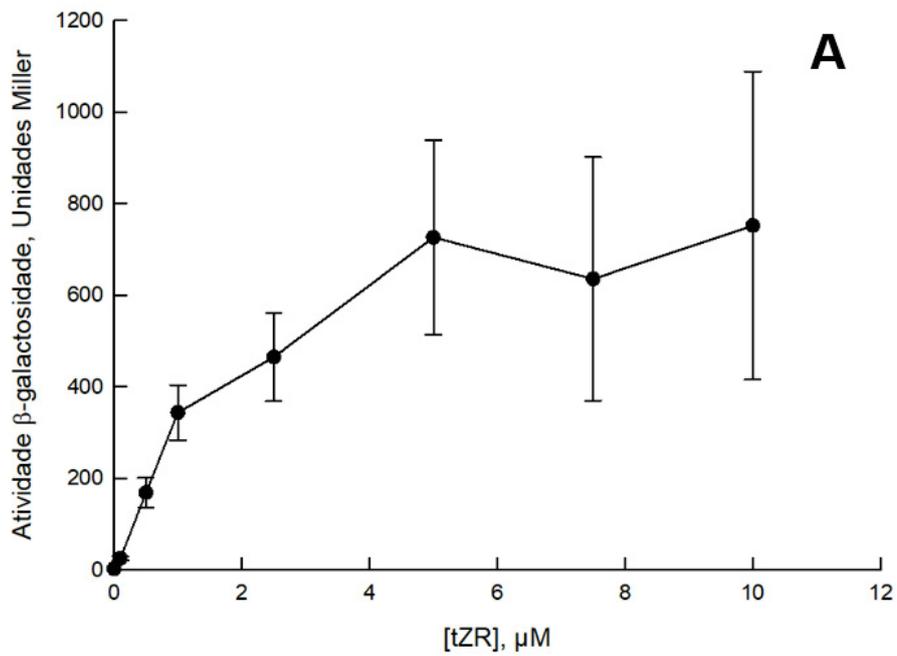


Figura 16. Curva de calibração para *E. coli* KMI001 usando receptor CRE1/AHK4.

Legenda: A) Concentração de tZR variando até 10 μM. B) Concentração de tZR variando até 1 μM.

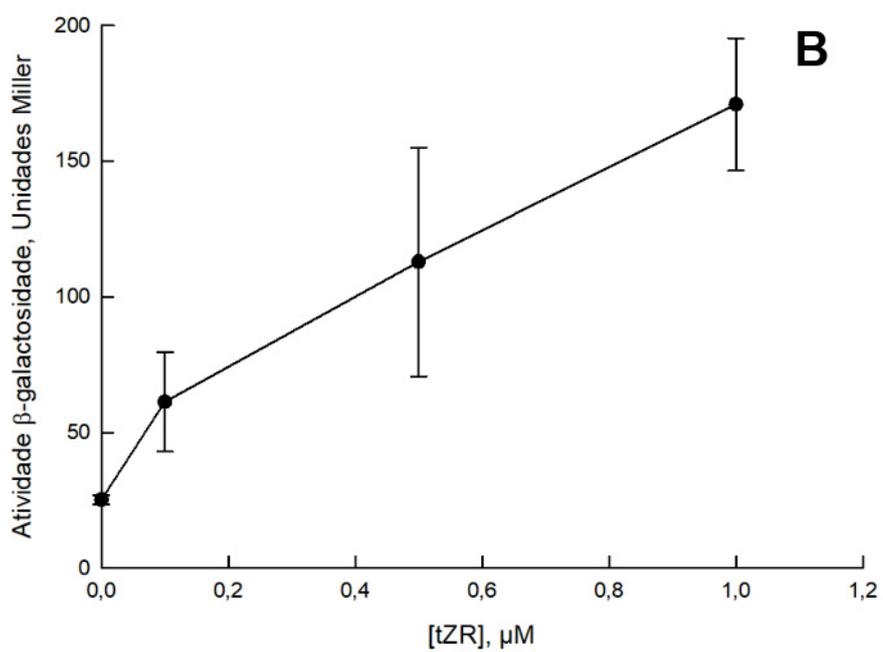
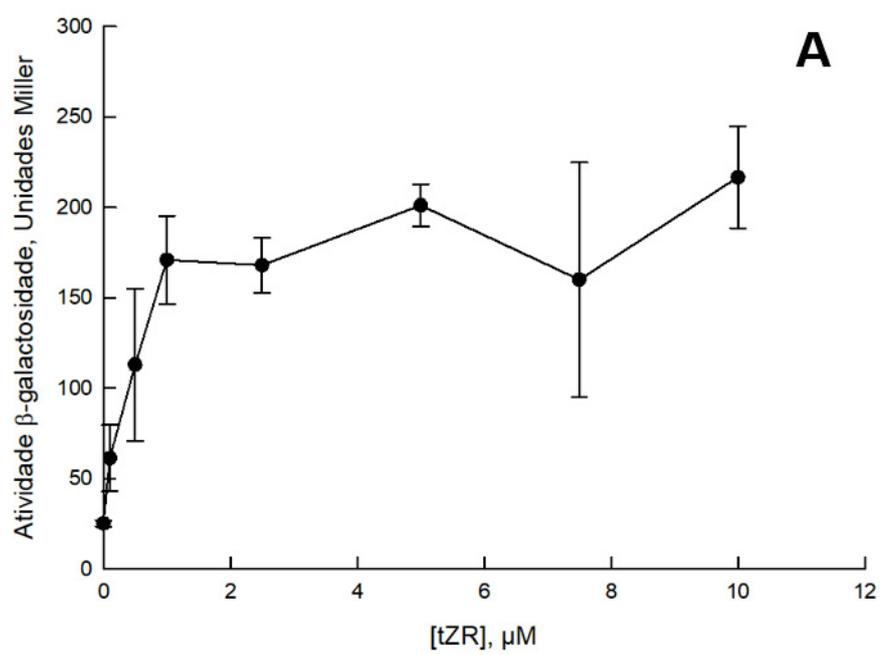


Figura 17. Curva de calibração para *E. coli* KMI001 usando receptor AHK3.

Legenda: A) Concentração de tZR variando até 10 μM. B) Concentração de tZR variando até 1 μM.

4.2. Caracterização inicial da produção de citocininas em *E. coli* recombinante

O primeiro plasmídeo construído neste trabalho (pKt_{mr}) foi transformado em *E. coli* MG1655 para avaliar o comportamento do sistema de produção heteróloga de citocininas. Como primeiro passo, utilizou-se como base o trabalho de TAKEI et al., 2001 para estabelecer as condições de cultivo; como nessa construção *tmr* está sobre o controle de um promotor induzível por lactose, optamos pelo uso de meio mínimo M9 com glicerol como fonte única de carbono para evitar uma possível repressão catabólica no promotor híbrido T5-*lac* (WANNER et al., 1978).

O resultado do bio-ensaio com citocininas extraídas dos sobrenadantes dos cultivos estão apresentados na Figura 18. Observou-se que os sobrenadantes dos cultivos controles (MG1655wt e K592008 (plasmídeo vazio)) não induziram atividade β -galactosidase, sugerindo que não há produção de citocininas pela bactéria selvagem. Nos sobrenadantes de *E. coli* pKt_{mr} com e sem indução por IPTG a 0,5 mM observou-se produção de composto semelhante a citocininas, induzindo atividades β -galactosidase entre 423 e 517 (sistema CRE1/AHK4) e entre 107 e 136 (sistema AHK3) unidades Miller, o que corresponde a níveis semelhantes das atividades obtidas com os padrões de iP e tZR. A análise estatística desses dados apontou que a produção de citocininas em cultivos não induzidos e induzidos foi similar, o que implica que o promotor T5-Lac que controla a expressão de *tmr* possui vazamento de expressão.

Comparando as atividades das amostras com aquelas medidas em culturas tratadas com os padrões de citocininas, estima-se que a concentração média da citocinina no extrato estava entre 0,74 e 3,2 μ M (Tabelas 16 e 17). Tais resultados são próximos dos valores de produção obtidos por TAKEI et al., 2001, que através de ensaio ELISA estimou que a concentração total de citocininas presente no sobrenadante de *E. coli* JM109 expressando o gene *tmr* de *Agrobacterium tumefaciens* ou os genes IPT1 a IPT8 de *Arabidopsis thaliana* estava entre 100 e 650 pmol/mL após 4h de cultivo, o que corresponde à produção de 0,6 a 3,9 μ M em 24h de cultivo. Com esses resultados conclui-se que o sistema de produção de citocininas é funcional em bactéria.

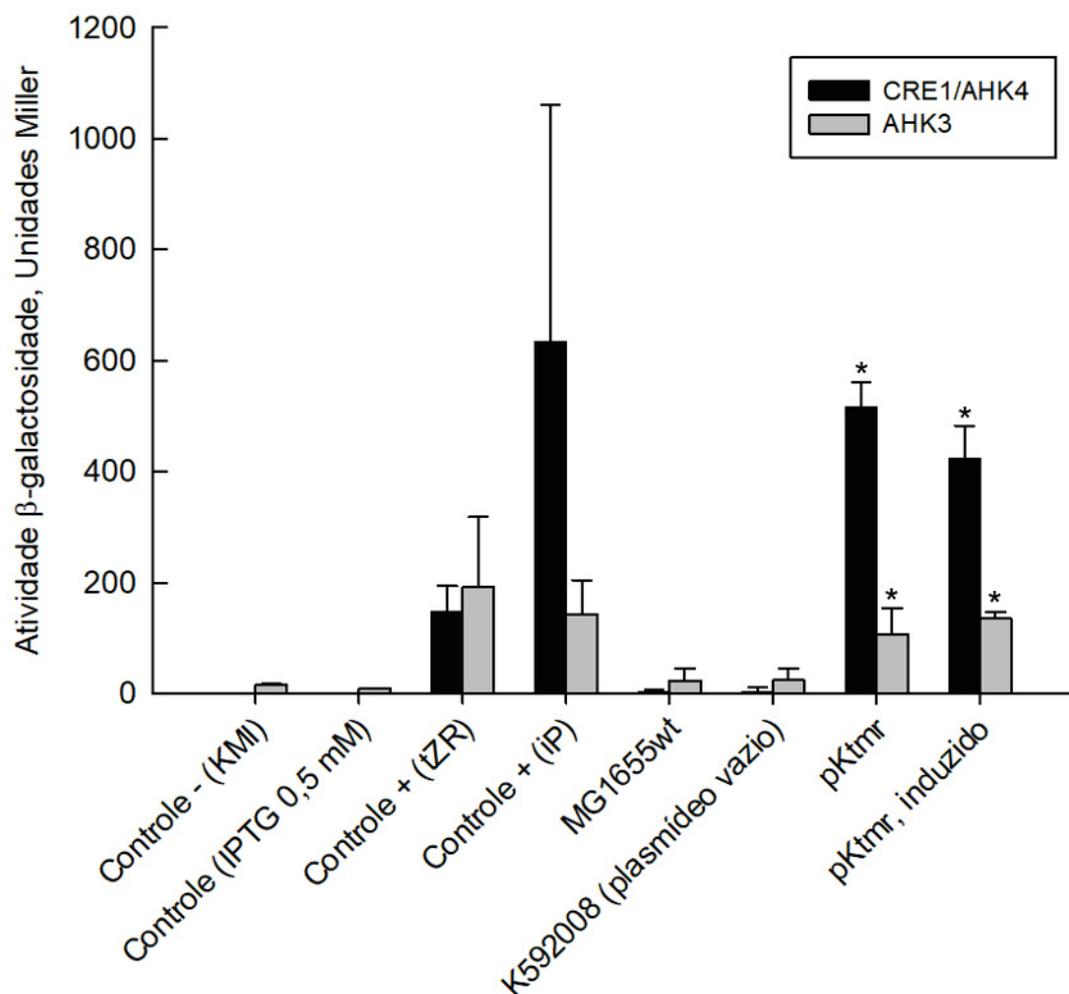


Figura 18. Bio-ensaio para detecção de citocininas no extrato butanólico do sobrenadante de culturas de *E. coli* MG1655 selvagem e recombinante (pKtmr), usando *E. coli* bio-sensora (KMI001) e receptores CRE1/AHK4 e AHK3.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI): bactéria sensora (*E. coli* KMI001), sem amostra. 2) Controle do bio-ensaio (IPTG 0,5 mM): *E. coli* KMI001 induzida com IPTG (concentração final de 0,5 mM). 3) e 4) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 5) MG1655wt: sobrenadante de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 6) MG1655 (plasmídeo vazio): sobrenadante de *E. coli* MG1655 transformada com plasmídeo vazio pK592008 (controle negativo de produção de citocininas). 7) pKtmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 pKtmr, sem indução. 8) pKtmr, induzido: sobrenadante de *E. coli* MG1655 pKtmr induzido com IPTG (concentração final

de 0,5 mM). As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de extrato butanólico do sobrenadante de cultivo. Bactérias foram cultivadas em 100 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL durante 24h. Asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao controle negativo K592008 (teste t bicaudal, $p < 0,05$).

Tabela 16. Estimativa de concentração de citocininas no sobrenadante de *E. coli* MG1655 recombinante pKt_{mr} usando *E. coli* KMI001 com receptor CRE1/AHK4.

Amostra	Concentração, µM (referência: padrão de iP)	Concentração, µM (referência: padrão de tZR)
<i>E. coli</i> pKt _{mr}	0,82	3,51
<i>E. coli</i> pKt _{mr} , induzido	0,67	2,88

Tabela 17. Estimativa de concentração de citocininas no sobrenadante de *E. coli* MG1655 recombinante pKt_{mr} usando *E. coli* KMI001 com receptor AHK3.

Amostra	Concentração, µM (referência: padrão de iP)	Concentração, µM (referência: padrão de tZR)
<i>E. coli</i> pKt _{mr}	0,74	0,73
<i>E. coli</i> pKt _{mr} , induzido	0,95	0,93

4.3. Cinética de crescimento e de produção de citocininas em *E. coli* recombinante

Para se observar o perfil de crescimento e produção de citocininas, cultivou-se *E. coli* MG1655 selvagem e recombinante (pKt_{mr}) durante 60h, com e sem suplementação de 1 g/L de adenina (Figuras 19 e 20). O objetivo da suplementação de adenina no meio foi observar se haveria aumento na produção de citocininas pela bactéria recombinante, uma vez que os derivados fosforilados de adenosina (AMP/ADP/ATP) são substratos usados pelas enzimas T_{mr} e Ipt₄. Pode-se observar que a bactéria recombinante possui um

crescimento bem menos expressivo do que a selvagem a partir de 24h de processo (Figura 19), provavelmente devido a um fardo metabólico gerado tanto pelo uso excessivo da maquinaria de expressão gênica quanto pelo sequestro excessivo de componentes da via dos isoprenóides (DMAPP/HMBDP) e do metabolismo energético (AMP/ADP/ATP, mais provavelmente AMP devido à preferência de substrato da enzima Tmr). A suplementação de adenina ao meio diminui o crescimento da *E. coli* selvagem e recombinante, já que a estirpe selvagem cresceu praticamente no mesmo ritmo da estirpe recombinante nessas condições. Tal fenômeno provavelmente se deve a um desbalanço do *pool* de nucleotídeos causado pelo excesso de adenina no interior celular, que é tóxico para *E. coli* (LEVINE; TAYLOR, 1982). Esse desbalanço provavelmente também deve ter sido o responsável pela redução da produção de citocininas em até 38% na bactéria recombinante quando cultivado na presença de adenina (Figura 20). Observou-se, também, que a produção de citocininas pela bactéria recombinante tem um comportamento linear ao longo do tempo, tanto na presença quanto na ausência de adenina (Figura 20).

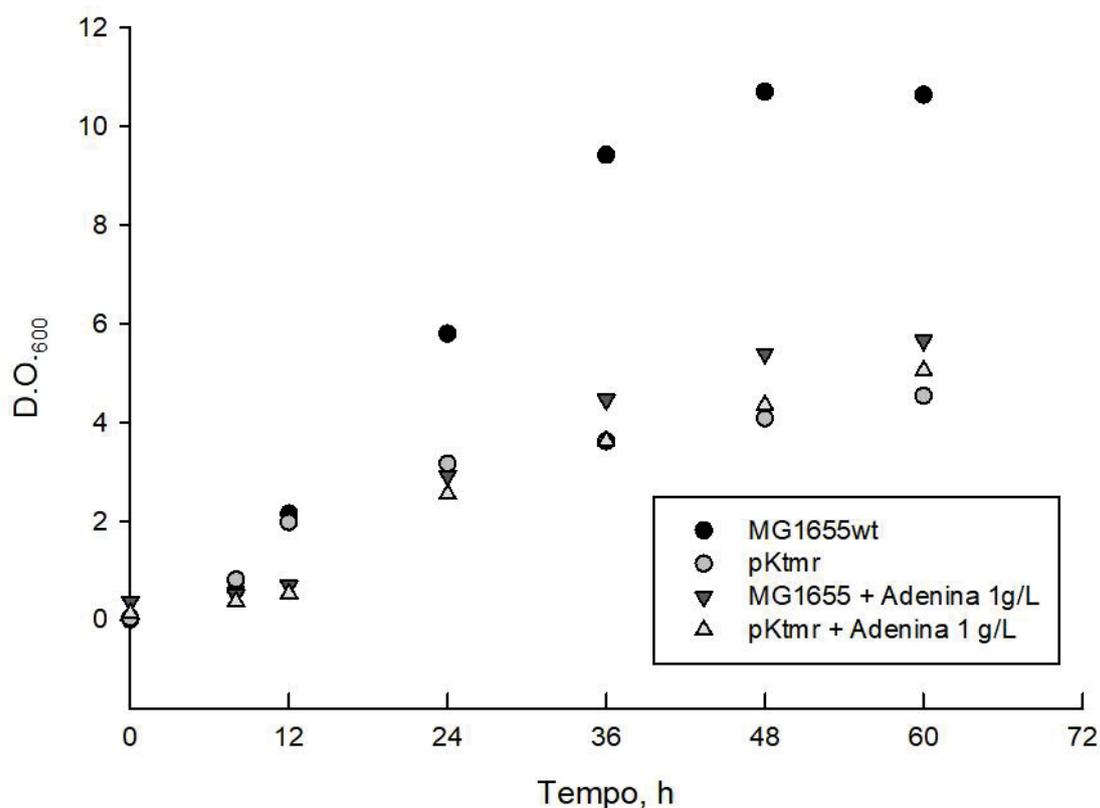


Figura 19. Cinética de crescimento de *E. coli* selvagem e recombinante (pKtmr) em meio mínimo M9 durante 60h de cultivo.

Legenda. Círculo preto: *E. coli* MG1655 selvagem. Círculo cinza: *E. coli* MG1655 recombinante (pKtmr). Triângulo invertido cinza: *E. coli* MG1655 selvagem cultivado em meio suplementado com adenina 1 g/L. Triângulo branco: *E. coli* MG1655 recombinante (pKtmr) cultivado em meio suplementado com adenina 1 g/L. Bactérias foram cultivadas durante 24h em 200 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL, com ou sem suplementação de adenina 1 g/L.

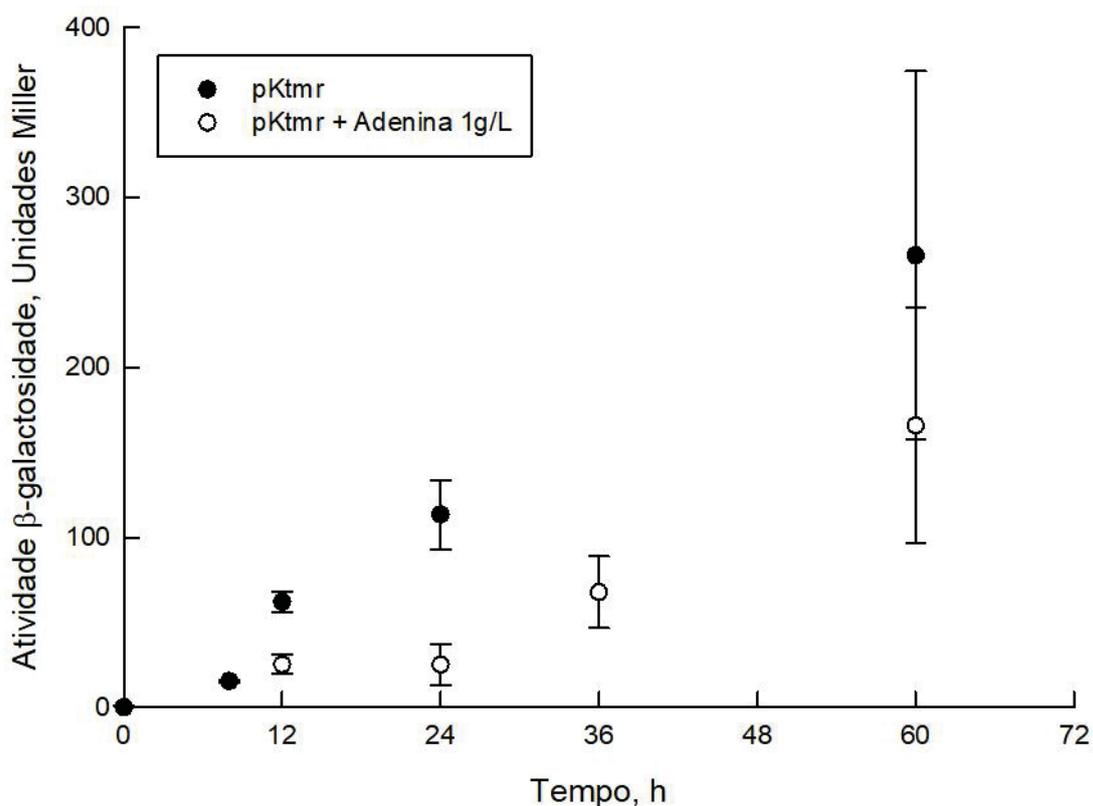


Figura 20. Cinética de produção de β -galactosidase induzida em *E. coli* sensora expressando o receptor AHK4 por citocininas presentes no sobrenadante de *E. coli* recombinante (pKtmr) em meio mínimo M9 durante 60h de cultivo.

Legenda. Círculo preto: *E. coli* MG1655 recombinante (pKtmr). Círculo branco: *E. coli* MG1655 recombinante (pKtmr) cultivado em meio suplementado com adenina 1 g/L. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes do sobrenadante de cultivo fresco. Bactérias foram cultivadas durante 24h em 200 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL, com ou sem suplementação de adenina 1 g/L.

4.4. Caracterização de produção de citocininas usando promotores induzíveis

Assim que todos os plasmídeos induzíveis foram construídos, foi realizada uma avaliação dos genes *tmr* ou IPT4 sob controle desses promotores para produção de citocininas. Nessa etapa, os cultivos foram gerados sem indução com IPTG, uma vez que não houve diferença entre os cultivos induzidos e não-induzidos no experimento anterior (Figura 18). Investigou-se através do bio-

ensaio de detecção a quantidade de citocininas presente tanto no sobrenadante quanto no citosol das células. A análise estatística de variância ANOVA apontou que a concentração de citocininas no sobrenadante foi semelhante em todas as construções ($p = 0,642$). Além disso, amostras frescas provenientes da fração solúvel da biomassa apresentaram atividade β -galactosidase em média 100 vezes maior do que as amostras provenientes do sobrenadante (Figura 21). Tais resultados sugerem que em princípio a maior parte das moléculas produzidas pela bactéria recombinante (expressando tanto o gene *tmr* quanto o gene IPT4) mantém-se no citoplasma, e que de alguma forma parte da citocinina produzida escapa para o meio extracelular.

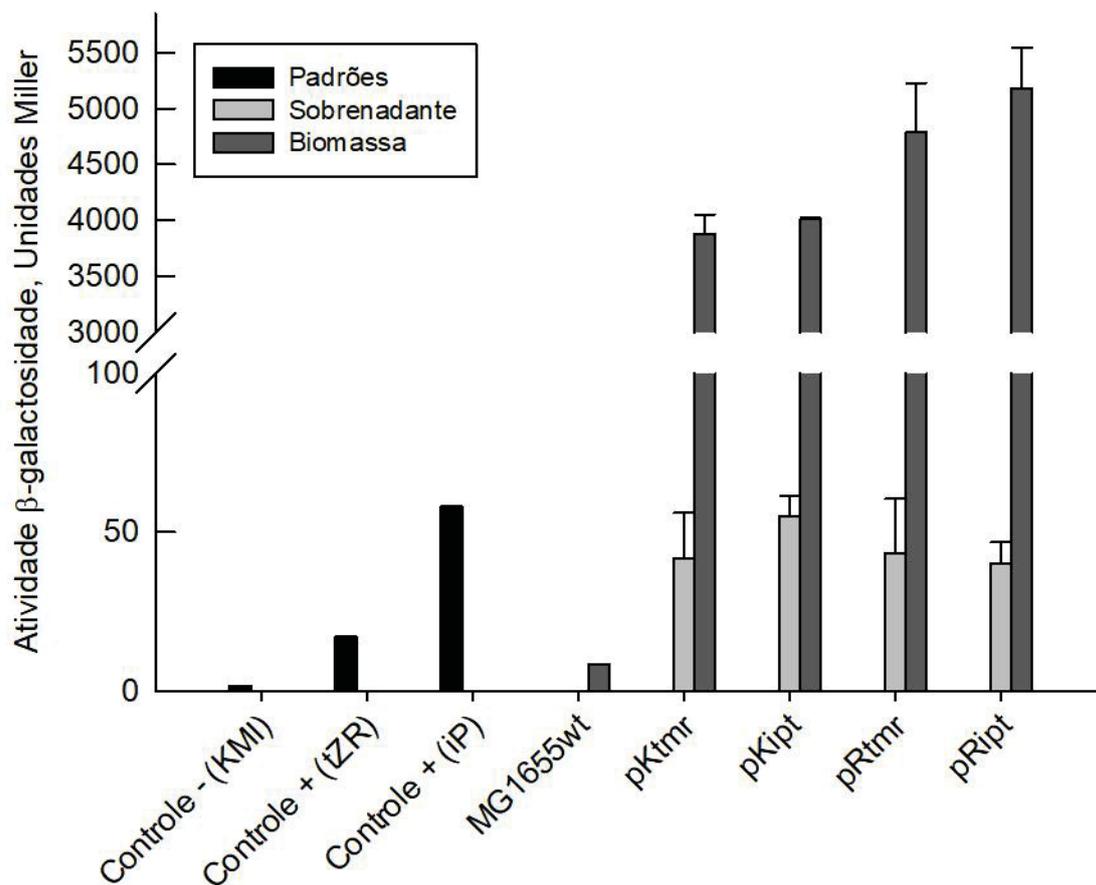


Figura 21. Bio-ensaio para detecção de citocininas no sobrenadante e no citosol de *E. coli* recombinante com genes *tmr* e IPT4 sob regulação de promotores induzíveis.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI): bactéria sensora (*E. coli* KMI001), sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) MG1655wt: sobrenadante e fração solúvel do citosol de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 5) pKtmr: sobrenadante e fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pKtmr, sem indução. 6) pKipt: sobrenadante e fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pKipt, sem indução. 7) pRtmr: sobrenadante e fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pRtmr, sem indução. 8) pRipt: sobrenadante e fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pRipt, sem indução. Barras pretas representam controles positivos e negativos. Barras cinza claro representam sinais de amostras provenientes do sobrenadante de cultivo. Barras cinza escuro representam sinais de amostras provenientes do citosol. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de sobrenadante de cultivo ou citosol fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL durante 24h.

Para comprovar que a atividade associada a biomassa era proveniente da indução por citocininas, o sítio ativo de Tmr e Ipt4 foram inativados por mutação sítio dirigida dos genes *tmr* e IPT4 sob controle do promotor Lac (pRtmr_D33A e pRipt_D37A). As atividades β -galactosidase obtidas no bio-ensaio com citosol fresco de *E. coli* expressando as enzimas mutagenizadas quanto as suas contrapartes ativas (pRtmr e pRipt) foram semelhantes. Tal resultado levantou a suspeita de que as amostras frescas do citosol usadas no bio-ensaio estivessem contaminadas com β -galactosidase proveniente da bactéria *E. coli* MG1655 usada na produção de citocininas. Uma vez que já tinha sido constatado que amostras frescas da bactéria selvagem não apresentaram atividade enzimática no bio-ensaio, suspeitou-se que *E. coli* MG1655 quando transformada com plasmídeo contendo um promotor *lac* sofre titulação do repressor LacI pelos promotores *lac* em grande quantidade contidos nas múltiplas cópias dos plasmídeos inseridos na bactéria.

Para confirmar a hipótese, as bactérias recombinantes foram cultivadas com e sem adição de IPTG a 0,5 mM. *E. coli* MG1655 transformadas com plasmídeos vazios contendo os promotores T5-Lac ou Lac (K592008 e R0010,

respectivamente) foram usadas como controles adicionais. Todas as amostras frescas de citosol das bactérias transformadas com os plasmídeos demonstraram ter alta atividade β -galactosidase (Figura 22), comprovando a hipótese de que os vários sítios de ligação para o repressor LacI disponíveis nos plasmídeos titularam o repressor do seu sítio cromossomal e permitiram a expressão da β -galactosidase endógena. Esse fenômeno provavelmente ocorre devido ao alto número de cópias dos plasmídeos por célula (WILLIAMS et al., 1998), já que os plasmídeos usados nesse trabalho possuem em torno de 500-700 cópias por célula (SHETTY et al., 2008). Tal fenômeno impede que seja feita uma estimativa sobre os níveis intracelulares de citocinina, se existirem.

Tal fenômeno também explica o vazamento de expressão do gene *tmr* visto na Seção 4.2. Se nas bactérias recombinantes o operon *lac* está parcialmente ativo, mesmo na ausência de indutor, então muito provavelmente os genes *tmr*/IPT4 contido nos plasmídeos induzíveis também o estarão, por estarem em maior número de cópias em relação ao operon *lac* cromossomal. Outro ponto a se destacar é que a desrepressão do operon *lac* ocorreu em níveis, sendo que a adição de IPTG e a presença de alta quantidade de plasmídeos com sítio de repressão para LacI contribuem de forma sinérgica, com o valor máximo de atividade β -galactosidase ocorrendo quando os dois fatores estavam envolvidos.

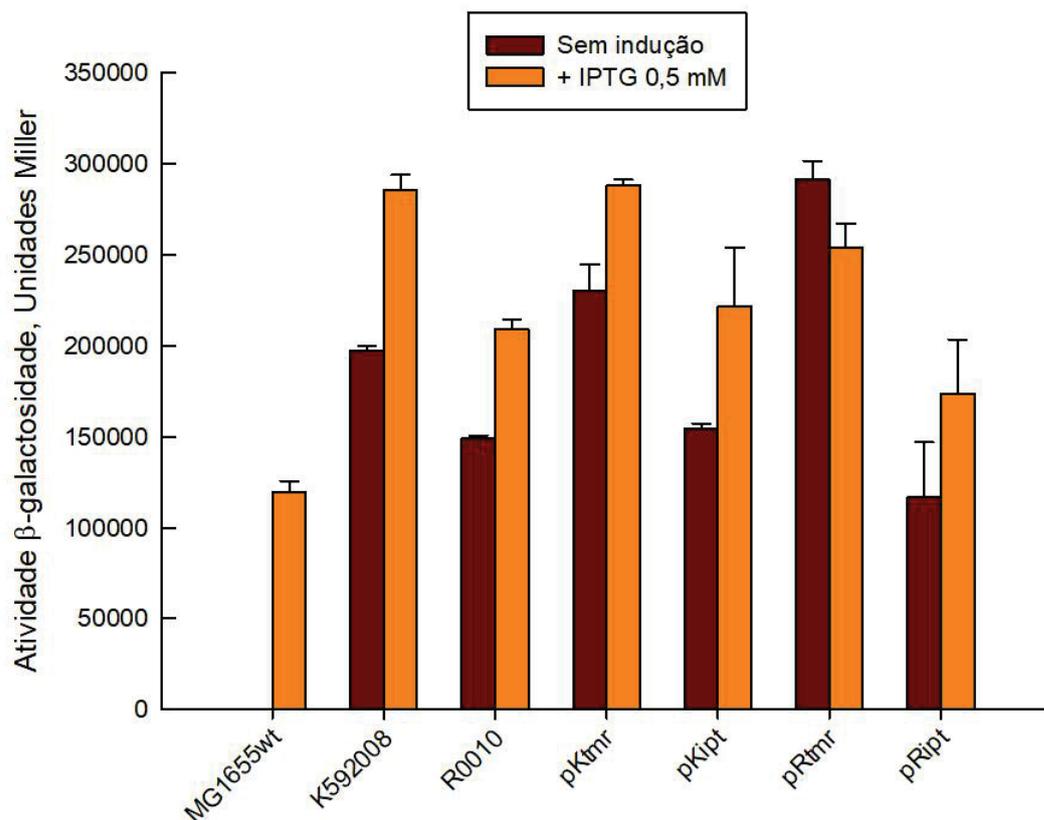


Figura 22. Atividade β -galactosidase do citosol de *E. coli* MG1655 transformada com plasmídeos contendo promotor T5-lac (K592008) e Lac (R0010).

Legenda. 1) MG1655wt: fração solúvel do citosol de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 2) K592008: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pK592008 (controle negativo de produção de citocininas). 3) R0010: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pR0010 (controle negativo de produção de citocininas). 4) pKtmr: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pKtmr. 5) pKipt: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pKipt. 6) pRtmr: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pRtmr. 7) pRipt: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pRipt. Barras vermelhas representam sinais provenientes de bactérias que não foram induzidas. Barras amarelas representam sinais provenientes de bactérias que foram induzidas com IPTG 0,5 mM. As amostras usadas no ensaio enzimático são provenientes de citosol fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL durante 24h.

Ao analisar o resultado do bio-ensaio de detecção de citocininas para o sobrenadante dos cultivos (Figuras 23 e 24), percebeu-se que as amostras provenientes da bactéria selvagem induzida e de bactérias transformadas com plasmídeo vazio apresentaram uma pequena atividade β -galactosidase contaminante, provavelmente devido à lise celular durante a centrifugação – estimado em 0,15%, quando compara-se as atividades enzimáticas das amostras frescas de sobrenadante e do citosol. Entretanto, todas as amostras provenientes de bactérias recombinantes apresentaram valores superiores de atividade β -galactosidase aos valores de bactérias transformadas com plasmídeos vazios, indicando que essa contaminação não afetou a análise, ao contrário do que ocorreu na análise do citosol. Nota-se também que a atividade β -galactosidase induzida pelo sobrenadante dos cultivos em geral foi estatisticamente semelhante (com valores de p variando entre 0,068 e 0,744), tendo como notória exceção os cultivos induzidos provenientes de bactérias expressando a enzima Ipt4 (pKipt e pRipt; $p \leq 0,012$). Tal observação corrobora com a análise prévia de extratos butanólicos do sobrenadante de *E. coli* pKtmr (ver Figura 18 da Seção 4.2) e com o resultado determinado anteriormente (Figura 21). É interessante observar com esses resultados que, no sistema de produção de citocininas desenvolvido nessa Tese, os promotores T5-lac e Lac atuam de forma muito similar a promotores constitutivos. Adicionar o repressor LacI expresso constitutivamente ao sistema, ou ainda trocar esses promotores por outros promotores que não sofram da titulação do respectivo repressor, ou ainda trocar por promotores que necessitem de ativadores específicos, provavelmente seja mais apropriado caso se deseje obter um controle mais fino do sistema.

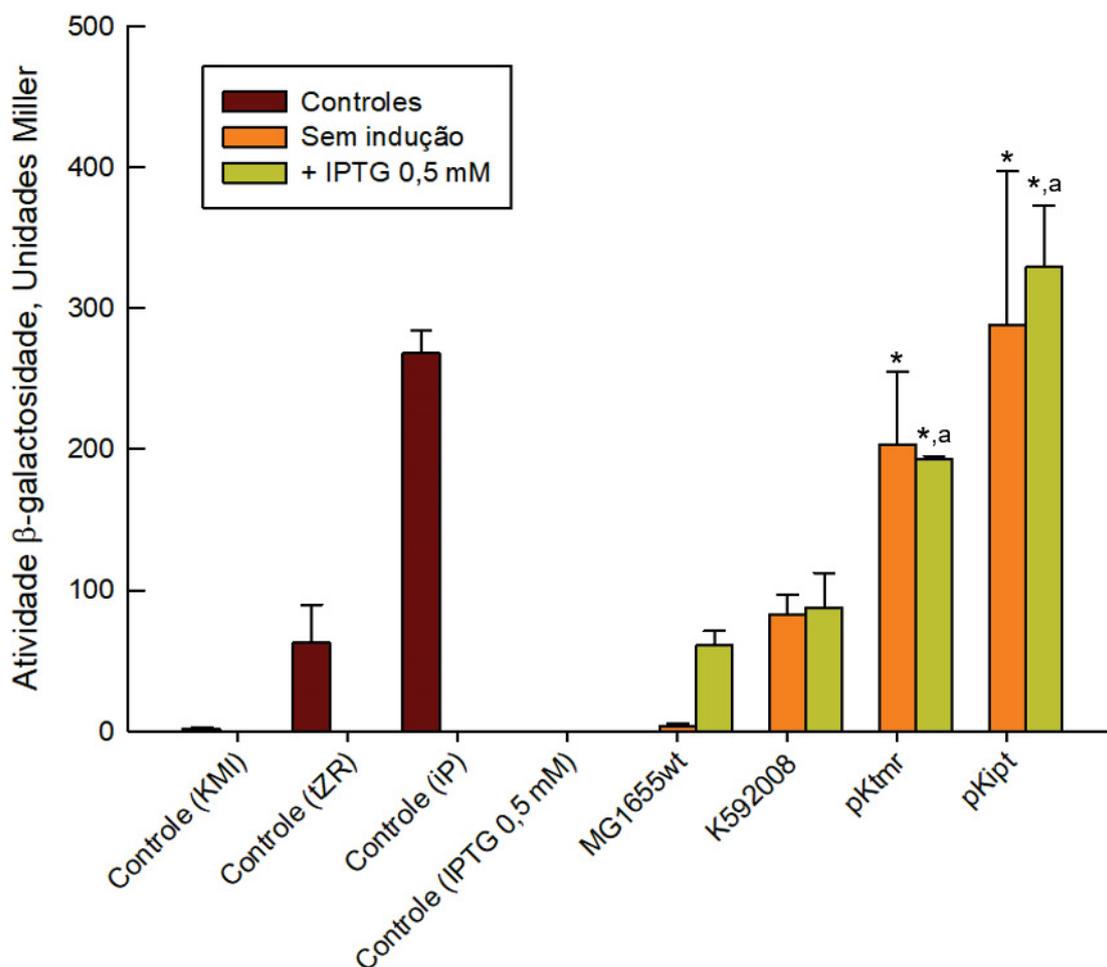


Figura 23. Bio-ensaio para detecção de citocininas no sobrenadante de *E. coli* recombinante com promotor T5-Lac (K592008).

Legenda. 1) Controle negativo do bioensaio (KMI): bactéria sensora (*E. coli* KMI001), sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bioensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) Controle do bioensaio (IPTG 0,5 mM): *E. coli* KMI001 induzida com IPTG (concentração final de 0,5 mM). 5) MG1655wt: sobrenadante de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 6) K592008: sobrenadante de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pK592008 (controle negativo de produção de citocininas). 7) pKtmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 pKtmr. 8) pKipt: sobrenadante de *E. coli* MG1655 pKipt. Barras vermelhas representam controles positivos e negativos. Barras laranja representam atividades provenientes de cultivos que não foram induzidos. Barras amarelas representam atividades provenientes de cultivos induzidos com IPTG 0,5 mM. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de sobrenadante de cultivo

fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL durante 24h. Asterisco (*) indicam diferença estatística em relação ao controle negativo MG1655 induzido com IPTG 0,5 mM (teste t bicaudal, $p < 0,01$). Letras (a) indicam diferença estatística entre amostras (teste t bicaudal, $p < 0,05$).

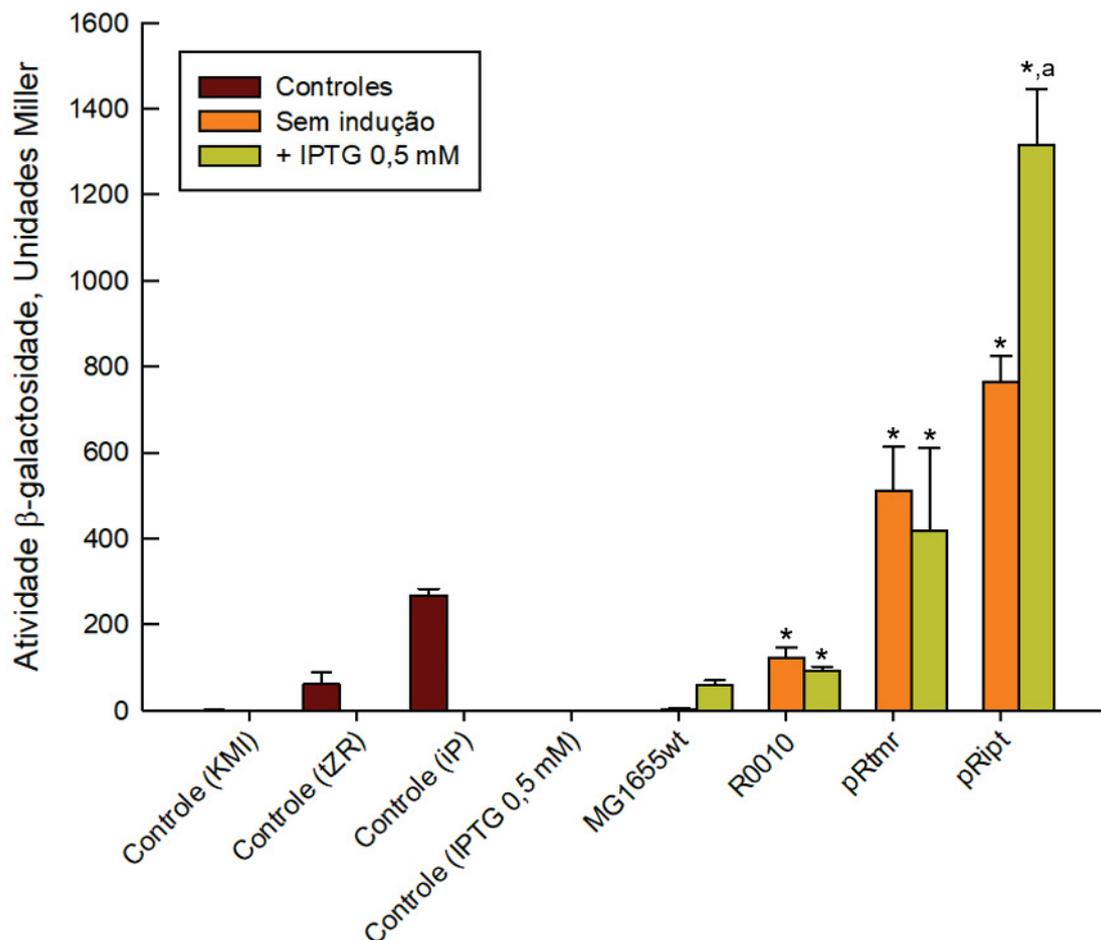


Figura 24. Bioensaio para detecção de citocininas no sobrenadante de *E. coli* recombinante com promotor Lac (R0010).

Legenda. 1) Controle negativo do bioensaio (KMI): bactéria sensora (*E. coli* KMI001), sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bioensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 µM). 4) Controle do bioensaio (IPTG 0,5 mM): *E. coli* KMI001 induzida com IPTG (concentração final de 0,5 mM). 5) MG1655wt: sobrenadante de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 6) R0010: sobrenadante de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pR0010 (controle negativo de

produção de citocininas). 7) pRtmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 pRtmr. 8) pRipt: sobrenadante de *E. coli* MG1655 pRipt. Barras vermelhas representam controles positivos e negativos. Barras laranja representam sinais provenientes de cultivos que não foram induzidos. Barras amarelas representam sinais provenientes de cultivos induzidos com IPTG 0,5 mM. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de sobrenadante de cultivo fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL durante 24h. Asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao controle negativo MG1655 induzido com IPTG 0,5 mM (teste t bicaudal, $p < 0,05$). Letras (a) indicam amostras com diferença estatística em relação a outras amostras que não sejam controles (MG1655 e R0010, induzidos e não-induzidos; teste t bicaudal, $p < 0,05$).

4.5. Caracterização de produção de citocininas usando promotores constitutivos

Nessa etapa do trabalho, testou-se o comportamento de bactérias contendo os genes *tmr*/IPT4 expressos de forma constitutiva. A fim de caracterizar o perfil de expressão dos promotores constitutivos nas condições usadas na produção de citocininas, construímos plasmídeos que expressam a proteína fluorescente vermelha (mRFP1) sob controle desses promotores. Essas construções foram avaliadas na *E. coli* MG1655 cultivada nas mesmas condições a serem usadas nos ensaios de produção de citocininas. O resultado dessa caracterização encontra-se na Figura 25. Em geral, os promotores apresentaram comportamento semelhante ao que é descrito no Registry of Standard Biological Parts (parts.igem.org), com exceção do promotor J23119. Esse promotor tem a sequência consenso dos sítios -10 e -35 para *E. coli* e é descrito como o promotor mais forte; entretanto, a fluorescência relativa das bactérias expressando RFP sob controle desse promotor foi 72,18% do valor das bactérias expressando o gene repórter sob controle do promotor J23100, que é descrito como o promotor que possui força de expressão idêntica ao promotor J23119. Conclui-se que apesar de serem partes biológicas já bem caracterizadas, é importante fazer a caracterização sob as condições particulares de cada trabalho, pois existe a possibilidade de alguma parte

biológica se comportar de forma inesperada ao usar estirpes diferentes de *E. coli* e/ou sob condições de cultivo diferentes.

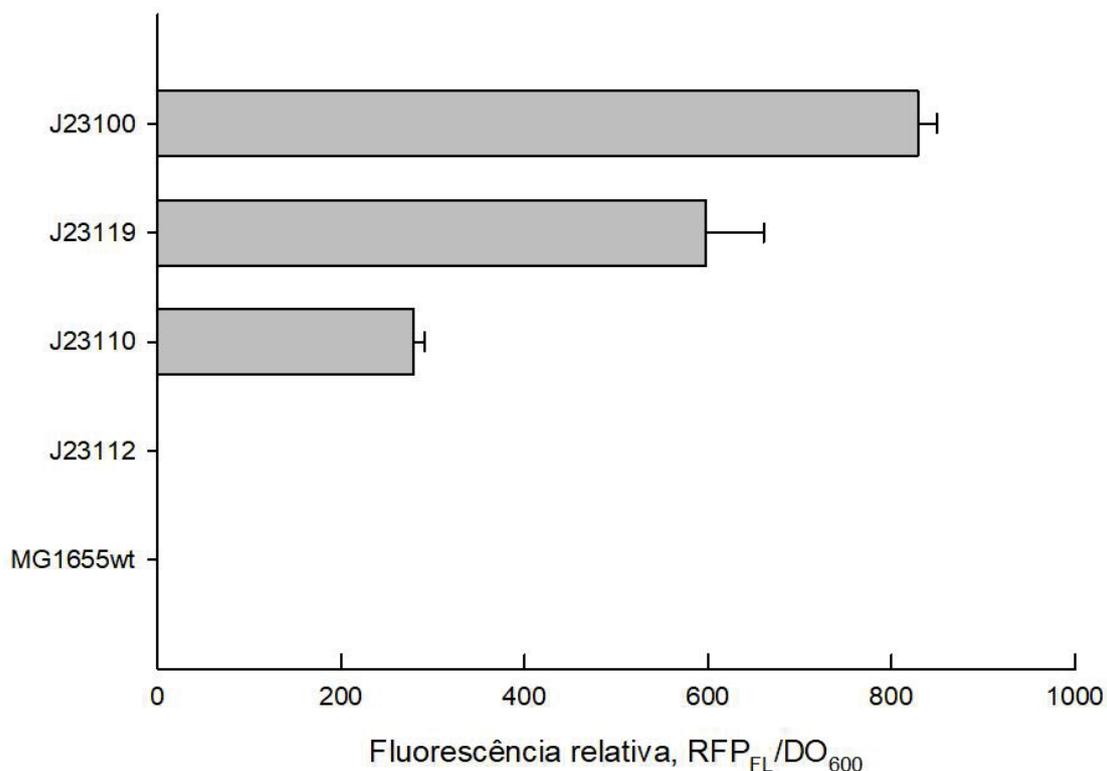


Figura 25. Força de promoção de transcrição de diferentes promotores constitutivos em *E. coli* MG1655 cultivada em meio M9 suplementado.

Legenda. A força de promoção é dada pela fluorescência relativa, definida como a taxa de fluorescência gerada pela proteína fluorescente RFP (em unidades de fluorescência, RFP_{FL}) em razão da taxa de variação da densidade ótica ($D.O_{600}$) da bactéria. Os dados correspondem ao uso de diferentes promotores: 1) J23100 (promotor muito forte); 2) J23119 (promotor muito forte); 3) J23110 (promotor forte); e 4) J23112 (promotor muito fraco). MG1655wt corresponde à fluorescência relativa natural de *E. coli* MG1655wt (controle negativo). Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 $\mu\text{g/mL}$ durante 8h.

Após a caracterização dos promotores constitutivos, um dos plasmídeos contendo o gene *tmr* sob controle de promotor constitutivo teve o sítio catalítico inativado, trocando o resíduo catalítico de aspartato na posição 33 por um resíduo de alanina (resultando na construção do plasmídeo pJ100tmr_D33A). Cultivos de *E. coli* MG1655 transformadas com essa nova construção e com sua contraparte (pJ100tmr) foram realizadas, e o resultado do bio-ensaio das amostras relativas ao sobrenadante e citosol estão apresentados nas Figuras 26 e 27. Percebe-se que o sobrenadante de cultura da bactéria selvagem e da bactéria transformada com o plasmídeo vazio (J23119wt) induziram baixa atividade β -galactosidase, confirmando a hipótese formulada na seção anterior sobre a titulação do repressor LacI por sítios de ligação nos promotores *lac*. De fato, determinou-se apenas atividade basal de atividade β -galactosidase contaminante nas amostras de citosol devido à expressão basal da enzima, que não atrapalharam a análise. Portanto, a expressão dos genes *tmr* e IPT4 por um promotor constitutivo parece ser uma alternativa segura para contornar a atividade β -galactosidase endógena e ter dados mais consistentes da produção de citocininas.

Observou-se que as amostras de sobrenadante referentes à bactéria recombinante com a enzima mutante (pJ100tmr_D33A) comportou-se de forma idêntica à bactéria selvagem, enquanto as amostras da bactéria recombinante com o gene funcional (pJ100tmr) induziram atividade β -galactosidase (Figura 26). Esses resultados apontam que o chassi de expressão está de fato expressando uma enzima isopentenil transferase funcional e que a atividade enzimática observada nos bio-ensaios de fato se deve à indução causada por citocininas produzidas pela *E. coli* recombinante.

Outro ponto interessante a se observar é que foi possível analisar as amostras de extratos livres de células, o que não foi possível fazer anteriormente com promotores induzíveis *lac* devido à contaminação por β -galactosidase endógena (Figura 27). A análise estatística de variância entre as médias (one way ANOVA) apontou que as atividades β -galactosidase induzidas pelos extratos livres de células no bio-ensaio eram significativamente diferentes entre si ($p < 0,038$). Entretanto, análise estatística em pares (teste t de Student) demonstrou que o extrato livre da bactéria J100tmr não é diferente estatisticamente dos extratos livres da bactéria selvagem e da bactéria

expressando a enzima Tmr mutada ($p = 0,087$ e $p = 0,057$, respectivamente). Tais resultados indicam que provavelmente toda citocinina produzida pelas bactérias recombinantes encontra-se no meio extracelular, e que há pouca citocinina no citoplasma. Outra hipótese plausível é que, caso haja citocininas no extrato livre das bactérias recombinantes, elas estejam majoritariamente na forma fosforilada e conseqüentemente não serão detectadas pelo bio-ensaio, que é ativado somente quando está em contato por citocininas não-fosforiladas (SPÍCHAL et al., 2004). Essa hipótese se baseia no fato de que a reação enzimática das enzimas Tmr e Ipt4 resulta em citocininas fosforiladas (SAKAKIBARA et al., 2005).

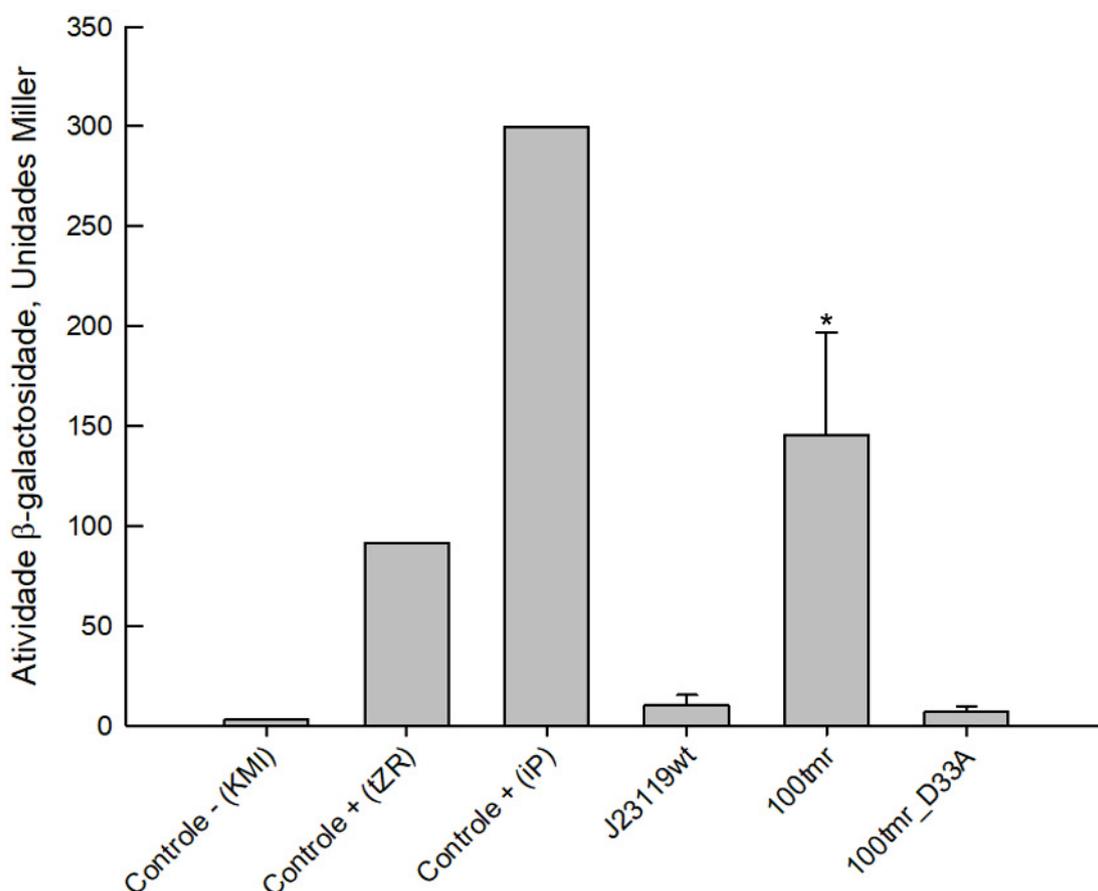


Figura 26. Efeito da inativação do sítio ativo da enzima Tmr na quantidade de citocininas secretadas por *E. coli* MG1655 recombinante.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI): bactéria sensora *E. coli* KMI001, sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) J23119wt: sobrenadante de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio

pJ23119wt (controle negativo de produção de citocininas). 5) 100tmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 J100tmr. 6) 100tmr_D33A: sobrenadante de *E. coli* MG1655 J100tmr_D33A. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de sobrenadante de cultivo fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL durante 24h. Asterisco (*) indica diferença estatística em relação ao controle negativo J23119wt (teste t bicaudal, $p < 0,005$).

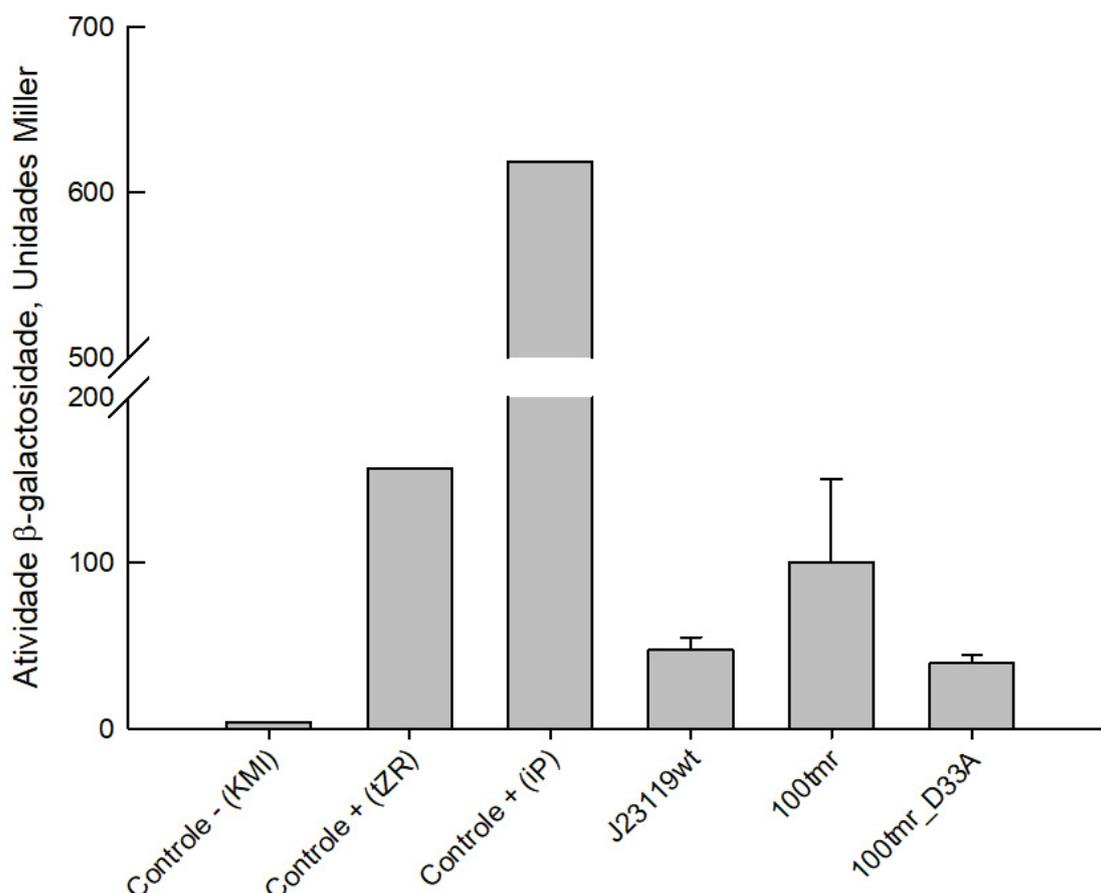


Figura 27. Efeito da inativação do sítio ativo da enzima *tmr* na quantidade de citocininas presente no interior celular de *E. coli* MG1655 recombinante.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI): bactéria sensora *E. coli* KMI001, sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 µM). 4) J23119wt: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pJ23119wt (controle negativo de produção de citocininas). 5) 100tmr: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 J100tmr. 6) 100tmr_D33A: fração solúvel

do citosol de *E. coli* MG1655 J100tmr_D33A. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de citosol fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL durante 24h.

Na sequência, realizou-se cultivos de bactérias recombinantes contendo o gene *tmr* sob controle de promotores constitutivos (Figuras 28 e 30). A análise do bio-ensaio para amostras provenientes dos sobrenadantes das bactérias cultivadas mostrou que a produção de citocininas foi diretamente proporcional à força de expressão, embora não tenha ficado claro se a correlação entre essas variáveis é linear ou sigmoideal (Figura 29). Tais resultados são promissores, porque apontam em princípio que não há mecanismo de feedback negativo (inibição pelo produto) na enzima Tmr; em teoria, é possível aumentar ainda mais a produção de citocininas caso o gene *tmr* esteja sob controle de promotores com mais força de transcrição do que o promotor J23100.

Ao analisar a variância de médias (one way ANOVA) dos dados obtidos do bio-ensaio para amostras do extrato livres de célula, constatou-se que as médias eram semelhantes entre si ($p = 0,076$), corroborando com os dados obtidos anteriormente (Figura 27).

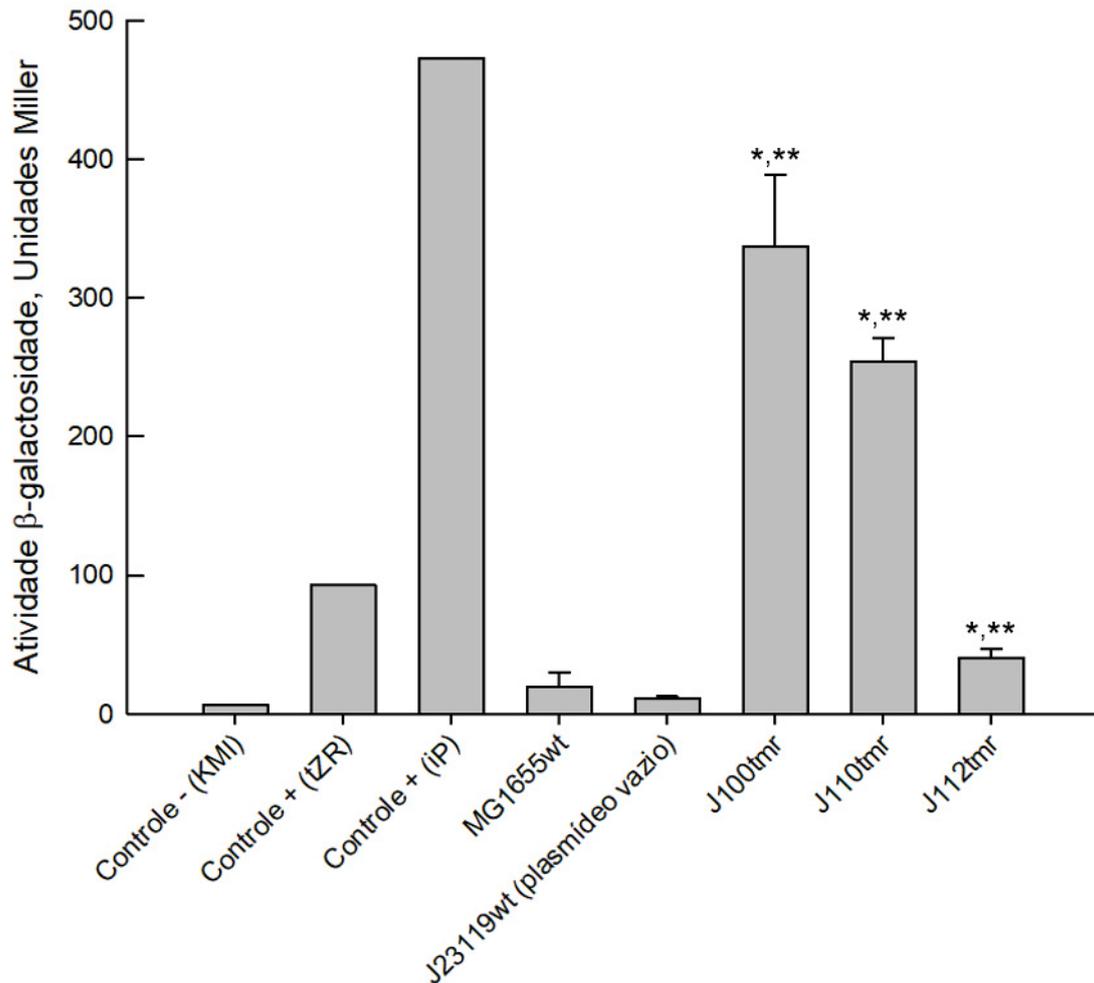


Figura 28. Bioensaio para detecção de citocininas no sobrenadante de *E. coli* recombinante com promotores constitutivos.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI): bactéria sensora *E. coli* KMI001, sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) MG1655wt: sobrenadante de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 5) J23119wt: sobrenadante de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pJ23119wt (controle negativo de produção de citocininas). 6) J100tmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 J100tmr. 7) J110tmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 J110tmr. 8) J112tmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 J112tmr. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de sobrenadante de cultivo fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL durante 24h. Asterisco simples (*) indicam diferença estatística em relação ao

controle negativo MG1655wt (teste t bicaudal, $p < 0,05$). Asteriscos duplos (**) indicam diferença estatística entre amostras (teste t bicaudal, $p < 0,05$).

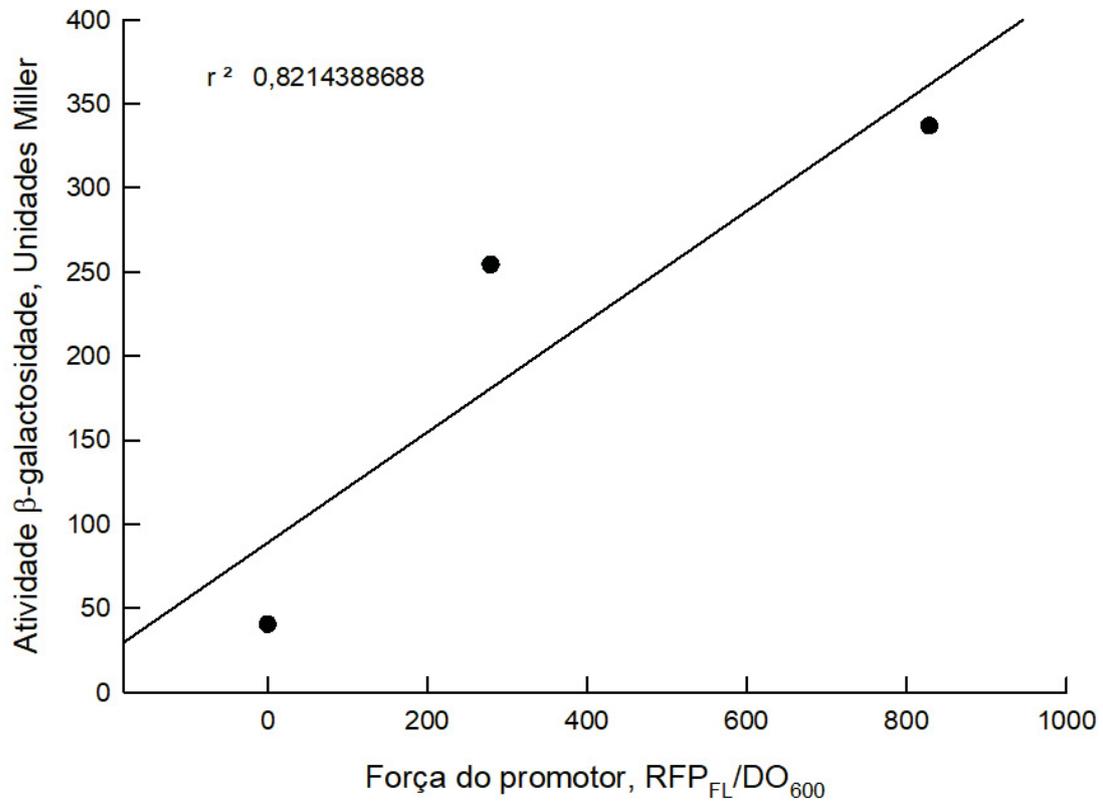


Figura 29. Correlação entre produção de citocinina extracelular e força de promoção da expressão gênica em *E. coli* expressando gene *tmr*.

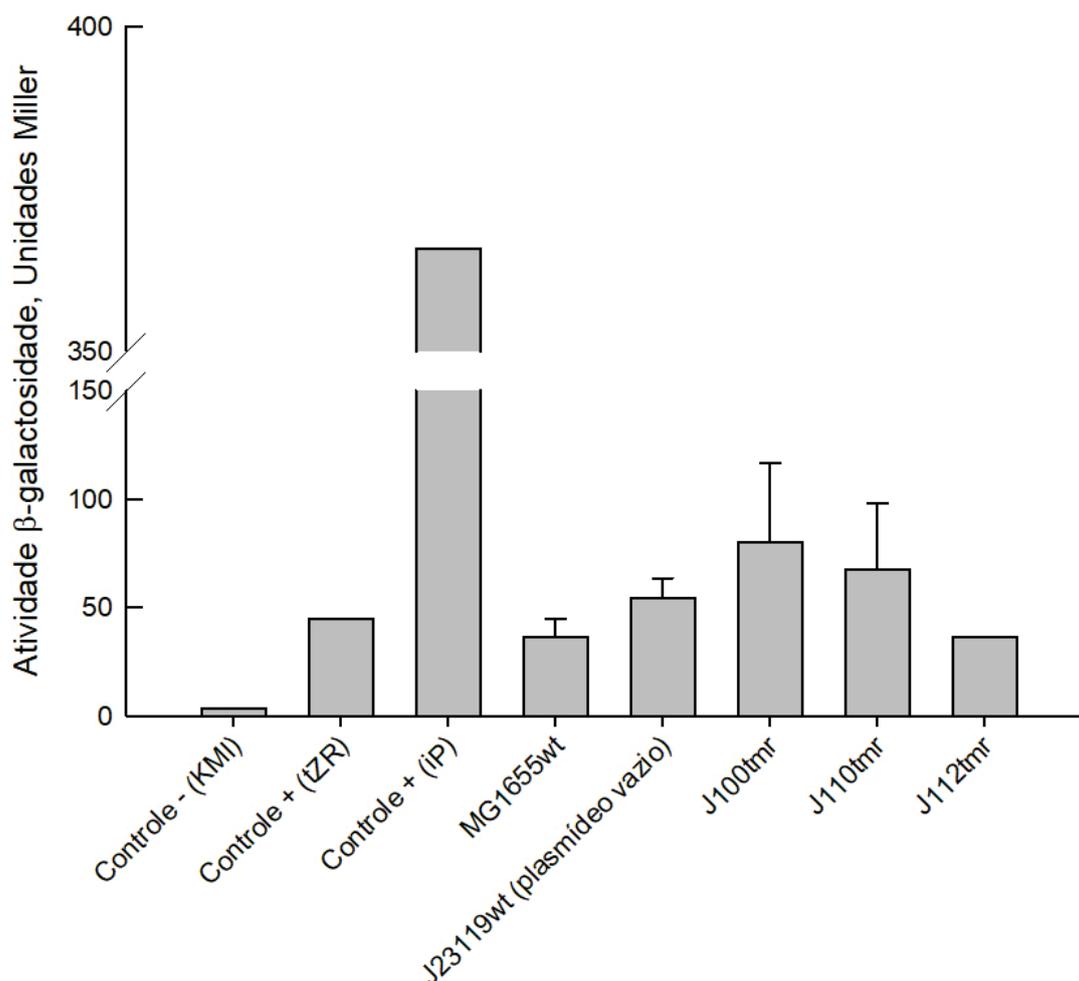


Figura 30. Bioensaio para detecção de citocininas na biomassa de *E. coli* recombinante com promotores constitutivos.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI): bactéria sensora *E. coli* KMI001, sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) MG1655wt: fração solúvel do citosol de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 5) J23119wt: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pJ23119wt (controle negativo de produção de citocininas). 6) J100tmr: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 J100tmr. 7) J110tmr: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 J110tmr. 8) J112tmr: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 J112tmr. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de citosol fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL durante 24h.

Uma vez que bactérias recombinantes foram cultivadas apenas em meio mínimo suplementado, cultivos de bactéria recombinante com o gene *tmr* (J100tmr) foram realizados em um meio nutricionalmente mais rico (LB) para avaliar se o meio influenciaria na produção de citocininas. Primeiramente foi checado se o meio LB desencadeia sinal falso-positivo na bactéria bio-sensora, o que não ocorreu (Figuras 31 e 32). Observou-se também que, ao contrário das expectativas, o cultivo em meio LB reduziu drasticamente a concentração de citocininas no sobrenadante, em torno de 74,54%, embora a quantidade de citocininas no sobrenadante da bactéria recombinante cultivada em meio LB ainda tenha sido estatisticamente relevante (Figura 31). Curiosamente, ao analisar as amostras provenientes do citosol das bactérias cultivadas foi constatado que a troca de meio aumenta de forma significativa a quantidade de β -galactosidase contaminante (Figura 32), o que implica potencial diferença no metabolismo celular entre bactérias cultivadas em meios diferentes. Essa diferença no pool de enzimas do citoplasma pode explicar a diferença na quantidade de citocininas presentes no meio extracelular: enzimas que interagem com as citocininas produzidas pela enzima Tmr podem estar sendo menos expressas, tornando essas moléculas indetectáveis pelo bio-ensaio; ou ainda, substratos da reação de isoprenilação mediada pela enzima Tmr podem estar sendo usadas em maior quantidade por outras vias metabólicas.

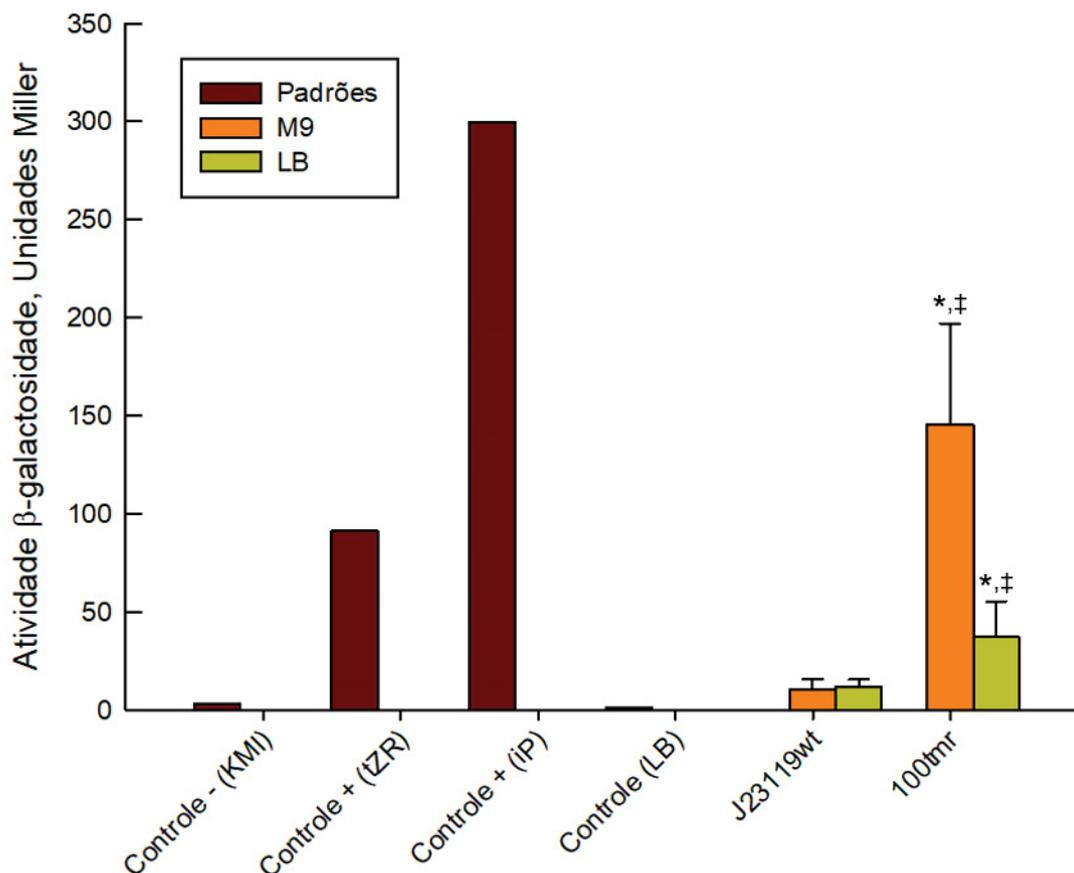


Figura 31. Bio-ensaio de detecção de citocininas em sobrenadante de *E. coli* MG1655 recombinante cultivadas em diferentes meios de cultivo.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI): bactéria sensora *E. coli* KMI001, sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) MG1655wt: sobrenadante de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 5) J23119wt: sobrenadante de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pJ23119wt (controle negativo de produção de citocininas). 6) J100tmr: sobrenadante de *E. coli* MG1655 J100tmr. Barras vermelhas representam controles positivos e negativos. Barras laranjas representam amostras de bactérias cultivadas em meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL. Barras amarelas representam amostras de bactérias cultivadas em meio LB. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de sobrenadante de cultivo fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL ou meio LB durante 24h. Asterisco (*)

indicam diferença estatística em comparação aos respectivos controles negativos para um dado meio de cultivo (teste t bicaudal, $p < 0,05$). Diferenças (\pm) indicam diferença estatística entre amostras da mesma bactéria, cultivadas em meios de cultivo distintos (teste t bicaudal, $p < 0,01$).

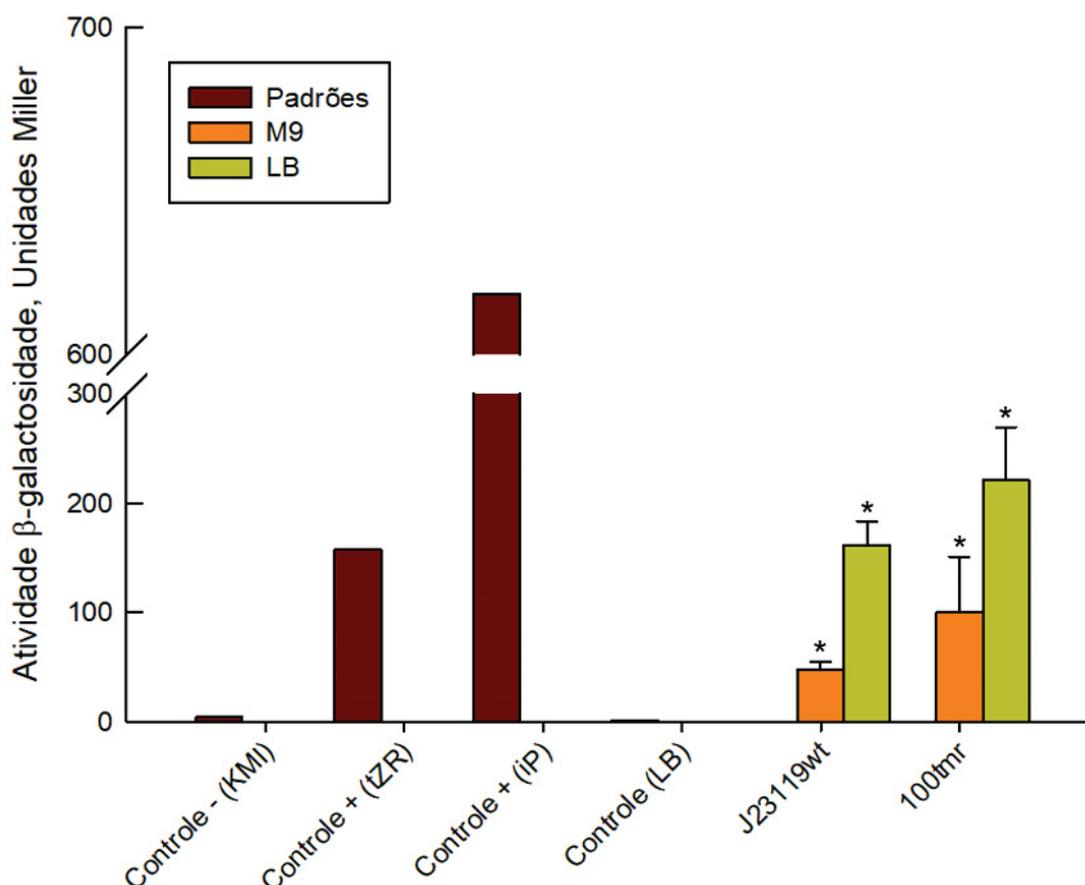


Figura 32. Bio-ensaio de detecção de citocininas em citoplasma de *E. coli* MG1655 recombinante cultivadas em diferentes meios de cultivo.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI001): bactéria sensora *E. coli* KMI001, sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) MG1655wt: sobrenadante de *E. coli* selvagem MG1655 (controle negativo de produção de citocininas). 5) J23119wt: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 contendo plasmídeo vazio pJ23119wt (controle negativo de produção de citocininas). 6) J100tmr: fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 J100tmr. Barras vermelhas representam controles positivos e negativos. Barras laranjas representam amostras de bactérias cultivadas em meio M9-glicerol 0,4%

suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL. Barras amarelas representam amostras de bactérias cultivadas em meio LB. As amostras usadas no bio-ensaio são provenientes de citosol fresco. Bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 µg/mL ou meio LB durante 24h. Asterisco (*) indicam diferença estatística entre amostras da mesma bactéria, cultivadas em meios de cultivo distintos (teste t bicaudal, $p < 0,05$).

4.6. Caracterização de citocininas produzidas por *E. coli* recombinante

Essa etapa do trabalho teve como objetivo identificar a molécula produzida pelas bactérias recombinantes com os genes *tmr* e IPT4 através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). O protocolo de NOVÁK et al., 2017 foi adaptado para os equipamentos existentes no laboratório, e a caracterização dos padrões de citocininas encontram-se na Tabela 18 e Figura 33.

Tabela 18. Padrões de citocininas analisadas em LC-MS.

Composto	Massa Isotópica Teórica	Massa Isotópica Experimental	Intensidade	Concentração, ng/mL	Tempo de retenção, min
tZ	220,119287	220,1169	110.111	1000	3,6
iP	204,124372	204,1202	147.383	100	6,5
tZR	352,161545	352,1672	135.916	1000	4,7
tZRMP	432,127876	432,1237	10.547	1000	2,3
iPRMP	416,122239	416,1329	22.985	1000	5,1

Legenda. Massa isotópica teórica: valor de massa/carga teórica. Massa isotópica experimental: valor de massa/carga obtida experimentalmente. Intensidade: intensidade do pico (sem unidade). Concentração: concentração do padrão, em ng/mL. Tempo de retenção: tempo de retenção na coluna, em min.

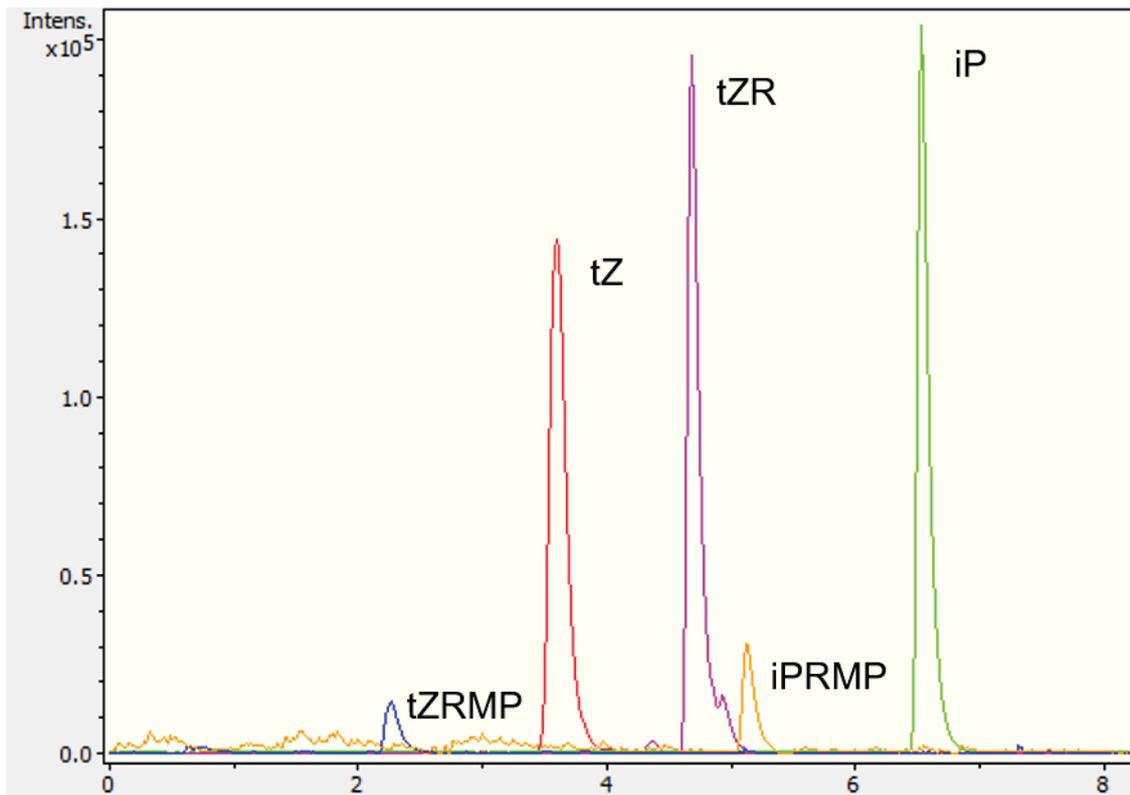


Figura 33. Padrões de citocininas analisadas em LC-MS.

Legenda. Linha azul: tZRMP. Linha vermelha: tZ. Linha roxa: tZR. Linha amarela: iPRMP. Linha verde: iP.

Após a adaptação do protocolo, tanto o sobrenadante quanto a fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 selvagem e recombinante (pKtmr e pKipt) usadas na Seção 4.2 foram extraídos com n-butanol segundo protocolo de HUSSAIN et al., 2017 e analisados em LC-MS. Nos extratos butanólicos dos sobrenadantes de cultivo, apenas na amostra de *E. coli* pKtmr foi encontrado um pico de isopentenil-adenina (iP) de área igual a 64.183, intensidade igual a 9.381 e concentração estimada de 4,66 ng/mL (Figura 34), e no espectro desse pico encontramos um íon de massa/carga igual a 204.1182 e intensidade igual a 3.141 (Figura 35).

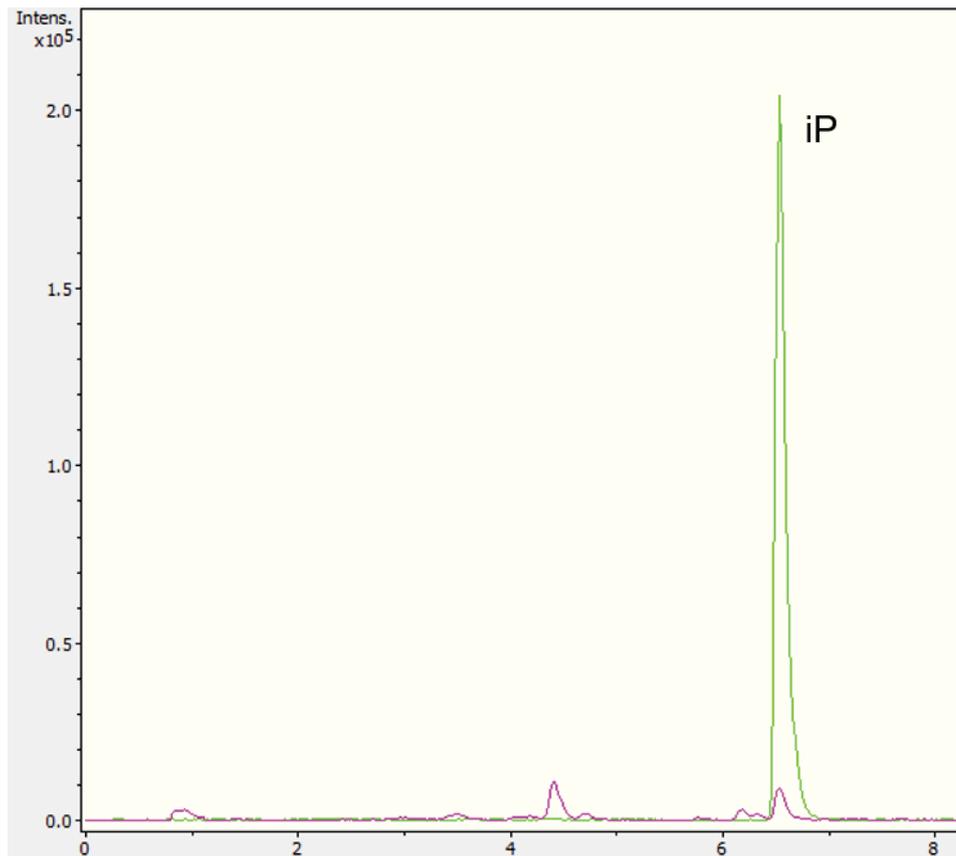


Figura 34. Cromatograma sobreposto de íon $204,1244 \pm 0,05$ de padrão de iP e do extrato butanólico de sobrenadante de cultivo de *E. coli* pKtmr.

Legenda. 1) Linha verde: padrão de iP, 100 ng/mL. 2) Linha rosa: extrato butanólico de sobrenadante de cultivo de *E. coli* pKtmr.

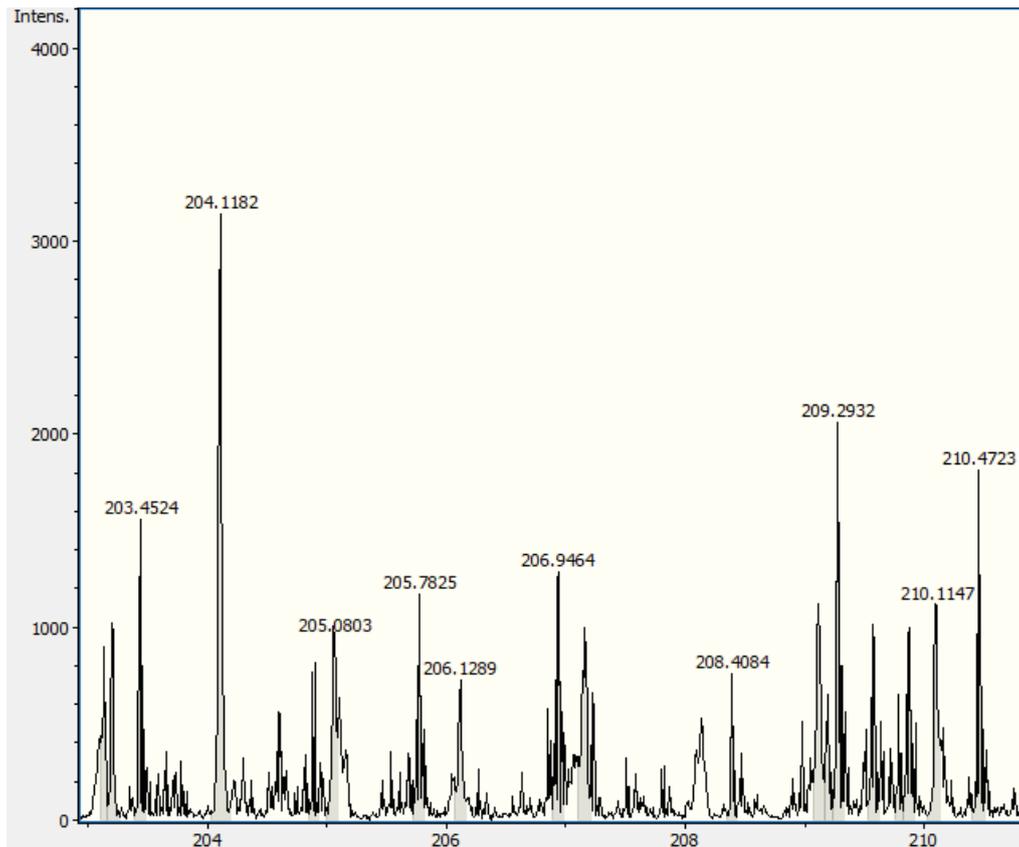


Figura 35. Espectro de massa de pico de iP em extrato butanólico de *E. coli* recombinante pKtmr.

A análise dos extratos butanólicos da fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 selvagem e recombinante em LC-MS mostrou a presença de um composto que não estava presente na amostra de *E. coli* selvagem e que foi detectado nas amostras de *E. coli* expressando as enzimas *Ipt4* e *Tmr*. Tal composto possuía relação massa/carga semelhante à iP (áreas iguais a 1.283.452 e 1.197.083 para *Ipt4* e *Tmr* respectivamente, e intensidades iguais a 139.244 e 141.957 para *Ipt* e *Tmr* respectivamente), mas seu tempo de retenção estava deslocado em relação aos padrões de isopentenil-adenina (iP) e isopentenil-adenosina monofosfato (iPRMP) (Figura 36). Uma vez que segundo a literatura o produto esperado da reação enzimática das enzimas *Ipt4* e *Tmr* são fosforilados (SAKAKIBARA, 2006) e que já foi reportado que citocininas podem se fragmentar na fonte durante análise por espectrometria de massa (a fragmentação ocorre entre a ligação da ribose com a nucleobase; LIU et al., 2012), é razoável supor que esse composto seja uma citocinina na forma de

nucleobase di- ou tri-fosforilada, uma vez que o tempo de retenção estava mais deslocado em relação ao padrão de iPRMP.

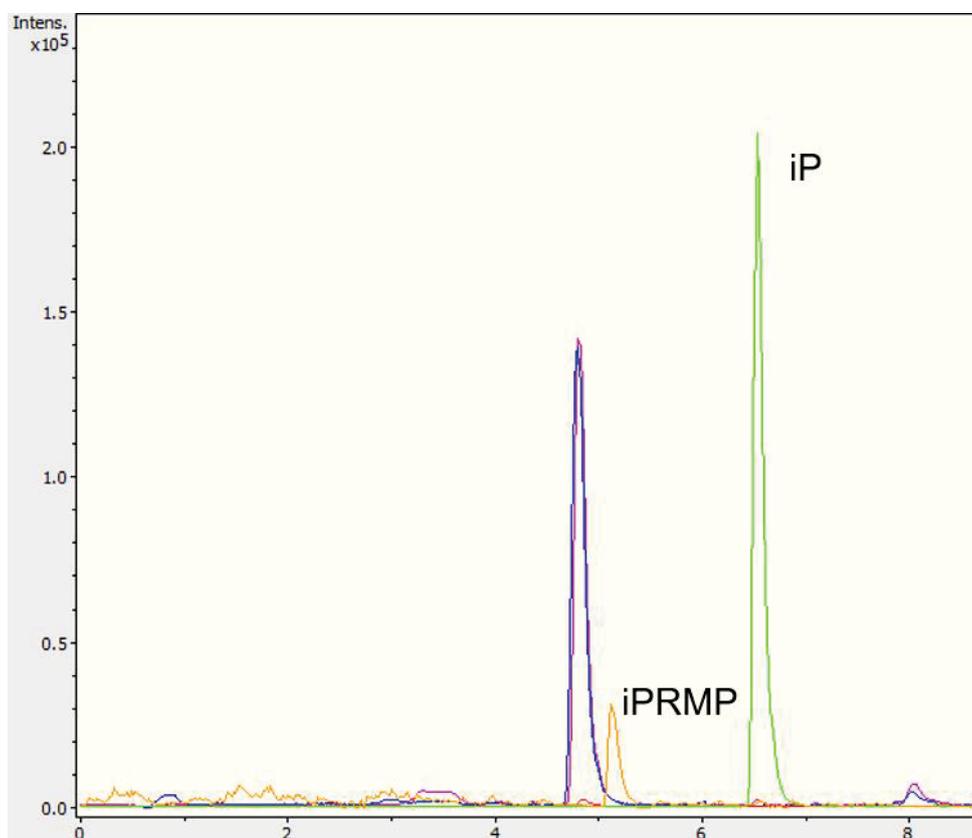


Figura 36. Cromatograma sobreposto de íon $204,1244 \pm 0,05$ de padrão de iP e de extrato butanólico de fração solúvel do citosol de cultivos de *E. coli* MG1655 selvagem e recombinante (pKt_{mr} e pK_{ipt}).

Legenda. 1) Linha verde: padrão de iP, 100 ng/mL. 2) Linha amarela: padrão de iPRMP, 1000 ng/mL. 3) Linha rosa: extrato butanólico da fração solúvel do citosol de *E. coli* pK_{t_{mr}}. 4) Linha azul: extrato butanólico da fração solúvel do citosol de *E. coli* pK_{ipt}. 5) Linha vermelha: extrato butanólico da fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655wt (controle negativo).

Além das considerações da literatura citadas no parágrafo anterior, sabendo que o sistema de detecção de citocininas não é ativado por citocininas fosforiladas (SPÍCHAL et al., 2004) e observando os resultados obtidos até o momento pelos bio-ensaios e pela espectrometria de massa, é plausível levantar a hipótese de que enzimas intracelulares estão interagindo com as citocininas produzidas pelas enzimas T_{mr} e I_{pt4}, desfosforilando uma fração dessas

moléculas. Em plantas, o estado de fosforilação de citocininas é mediado pelas enzimas adenina fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.7) e adenosina quinase (EC 2.7.1.20), ambas pertencentes à via de reciclagem de purinas (ASHIHARA et al., 2018). Essas enzimas também estão presentes na via de reciclagem de purinas de *E. coli* (NYGAARD, 1977). Entretanto enzimas de outras vias metabólicas que interagem com os níveis de fosforilação de adenosina fosfato (AMP/ADP/ATP) também são potenciais candidatas. A desfosforilação das citocininas produzidas pelas bactérias recombinantes pode estar sendo realizada por uma ou por várias enzimas, de forma sinérgica (Figura 37).

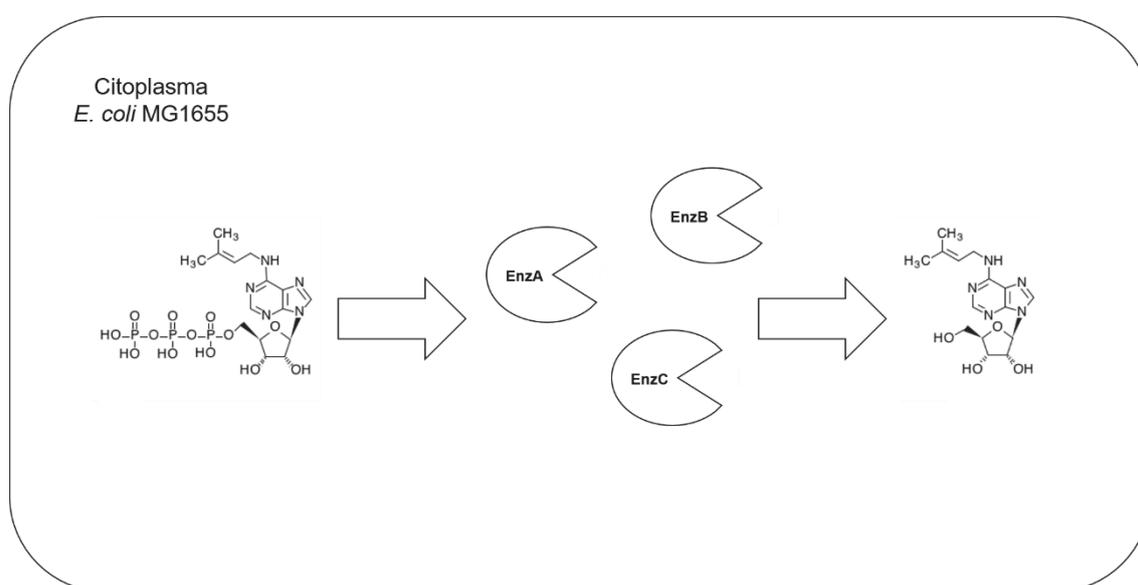


Figura 37. Hipótese de desfosforilação de citocininas produzidas por *E. coli* recombinante.

Legenda. 1) Enz: enzimas do citoplasma de *E. coli* MG1655.

Para comprovar essa hipótese, realizou-se o bio-ensaio incubando padrões de nucleotídeos de citocininas (*trans*-zeatina ribosídeo monofosfato e isopentenil-adenosina monofosfato; tZRMP e iPRMP, respectivamente) na presença de citoplasma de *E. coli* MG1655 selvagem (Figura 38). A hipótese levantada mostrou-se estar correta: na presença de enzimas bacterianas ativas, nucleotídeos de citocininas (que sozinhas não desencadeiam sinal na bactéria sensora) apresentam no bio-ensaio sinal equivalente à forma ativas do fito-hormônio em concentração similar, o que não ocorre caso essas moléculas

sejam incubadas com o mesmo *pool* de enzimas desnaturadas por calor (85°C, 15 min). Curiosamente, o sinal desencadeado pelos padrões de tZRMP e iPRMP após a ativação das enzimas de *E. coli* MG1655 tiveram sinal mais semelhante ao padrão de isopentenil-adenina (iP), o que pode indicar que essas moléculas perderam o ribosídeo e estão na forma de nucleobase. Não é possível deduzir se, caso essa hipótese seja correta, essa ativação ocorre logo após a desfosforilação da citocinina produzida, ou se ocorre de forma independente (Figura 39). Em *E. coli*, nucleosídeos podem ser clivados para liberação da base púrica por purina nucleosídeo fosforilases (NYGAARD, 1977), logo a hipótese de liberação da citocinina na forma de nucleobase em uma única etapa não pode ser descartada.

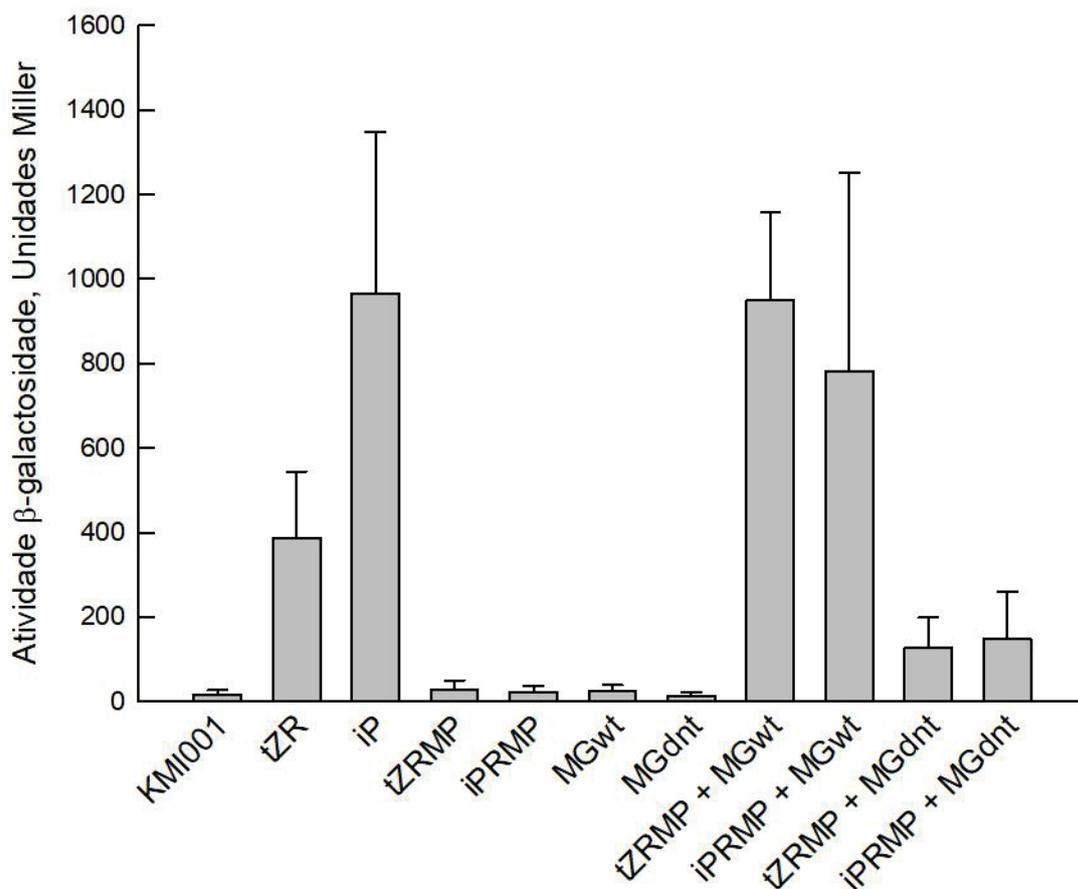


Figura 38. Ativação (desfosforilação) de citocininas por enzimas do citoplasma e/ou periplasma de *E. coli*.

Legenda. 1) Controle negativo do bio-ensaio (KMI001): bactéria sensora *E. coli* KMI001, sem amostra. 2) e 3) Controles positivos do bio-ensaio (tZR e iP): *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZR ou iP (concentração final de 1 μ M). 4) e 5) tZRMP e iPRMP: *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZRMP ou iPRMP (concentração final de 1 μ M). 6) MGwt: *E. coli* KMI001 incubada com fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655wt. 7) MGdnt: *E. coli* KMI001 incubada com fração solúvel do citosol desnaturado de *E. coli* MG1655wt. 8) e 9) tZRMP + MGwt e iPRMP + MGwt: *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZRMP ou iPRMP (concentração final de 1 μ M) e com fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655wt. 10) e 11) tZRMP + MGdnt e iPRMP + MGdnt: *E. coli* KMI001 incubada com padrão de tZRMP ou iPRMP (concentração final de 1 μ M) e com fração solúvel do citosol desnaturado de *E. coli* MG1655wt. O citosol fresco ou desnaturado foi obtido de bactérias cultivadas em 10 mL de meio M9-glicerol 0,4% suplementado com casaminoácidos 1% e tiamina 5 μ g/mL durante 24h.

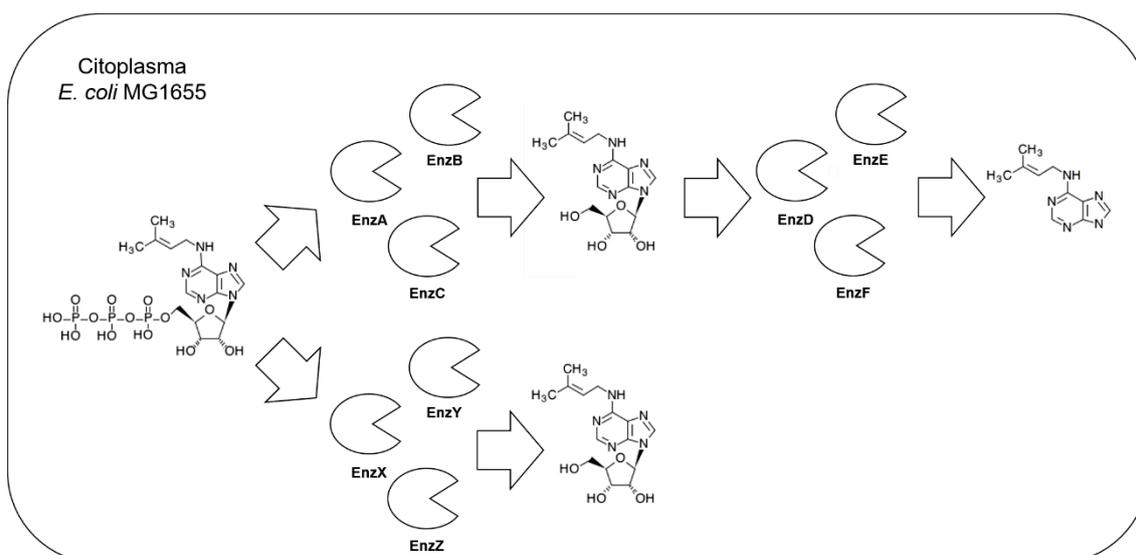


Figura 39. Hipóteses para ativação de citocininas produzidas por *E. coli* recombinante.

Legenda. 1) Enz: enzimas do citoplasma de *E. coli* MG1655.

Uma vez que adenosina fosfato e citocininas fosforiladas não são capazes de atravessar a membrana plasmática (YAGIL; BEACHAM, 1975; KAMÍNEK et al., 1997), é plausível que as citocininas produzidas pelas bactérias recombinantes estão sendo excretadas de forma inespecífica ou por algum tipo

de transportador. Usando ferramentas de bioinformática (BlastP), investigou-se no banco genômico do NCBI se existiam proteínas semelhantes às usadas por células vegetais ou por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) no genoma de *E. coli* para transportar citocininas através da membrana celular. Em *Arabidopsis thaliana*, citocininas são transportadas através de transportadores com cassete de ligação de ATP (ABCG14) ou através de permeases de purinas (AtPUP1 e AtPUP2) (SAKAKIBARA, 2006; ZHANG et al., 2014). Assim, buscou-se por genes que codificam para proteínas homólogas a esses transportadores no genoma de *Escherichia coli* MG1655. Nessa abordagem, não foi localizada nenhuma proteína com mais de 48% de cobertura e 48,65% de identidade. Ao mudar de abordagem, procurando por proteínas semelhantes aos transportadores de purinas NupC e NupG existentes em *E. coli* MG1655 (PATCHING et al., 2005) no genoma de *Azospirillum brasilense* (que é bactéria modelo de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e que secreta citocininas; CASSÁN et al., 2011), foram encontrados 2 transportadores de nucleosídeos (PZR08826.1 e PZP41335.1) homólogos à NupC com alta taxa de cobertura (81%) mas baixa taxa de identidade (27,38%). Análise de domínios proteicos através da ferramenta Pfam identificaram que os domínios de transporte C- e N- terminais estão presentes nas 3 proteínas (Figuras 41, 42 e 43). Como *A. brasilense* excreta citocininas na forma de nucleobases (iP e tZ) e nucleosídeos (iPR e tZR) para o exterior celular (CASTILLO et al., 2015) e seus transportadores são semelhantes aos de *E. coli*, provavelmente transportadores localizados na membrana plasmática da bactéria *E. coli* de fato sejam responsáveis pela presença de citocininas no exterior celular das bactérias recombinantes (Figura 43). É também provável que as citocininas na sua forma ativa sejam rapidamente exportadas para o sobrenadante, uma vez que bases púricas tendem a ser excretadas quando em excesso no meio intracelular (NYGAARD, 1977). Entretanto, visto que há indícios de que citocininas fosforiladas ainda estão presentes no citoplasma (Figura 36), é plausível supor que a desfosforilação e/ou liberação da nucleobase das citocininas produzidas pelas enzimas Tmr e Ipt4 em *E. coli* tenha algum tipo de gargalo, ou ainda que a reação de desfosforilação e/ou liberação da nucleobase dessas moléculas seja lenta.

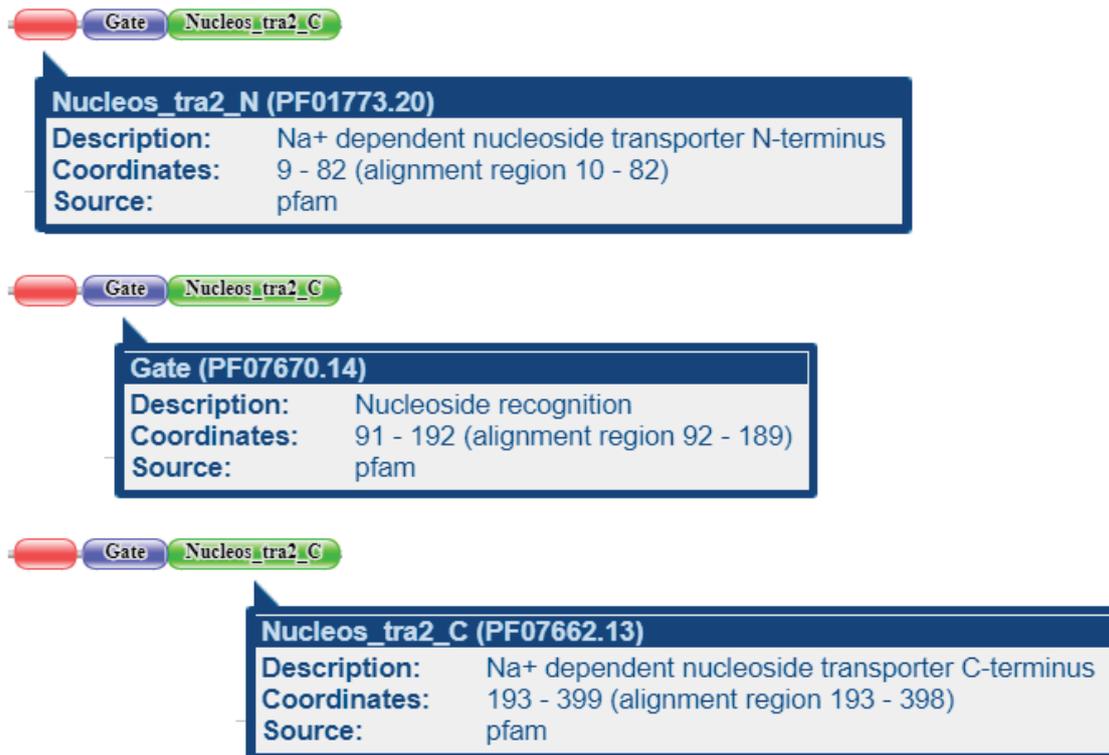


Figura 40. Análise de domínios proteicos em transportador de nucleosídeos de *E. coli* MG1655, NupC, através de ferramenta de bioinformática Pfam.

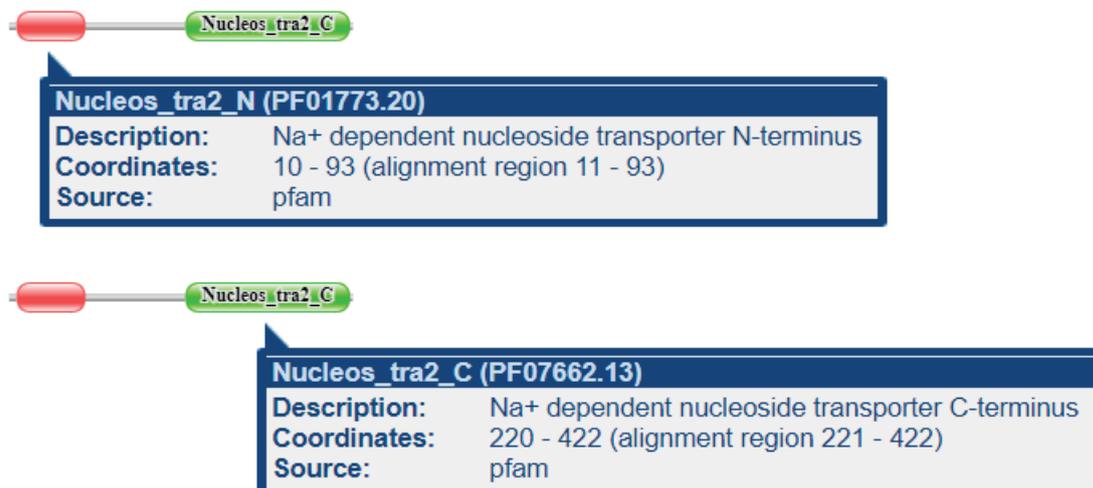


Figura 41. Análise de domínios proteicos em transportador de purina de *A. brasilense*, PZR08826.1, através de ferramenta de bioinformática Pfam.

Nucleos_tra2_C

Nucleos_tra2_N (PF01773.20)

Description: Na⁺ dependent nucleoside transporter N-terminus
Coordinates: 8 - 91 (alignment region 9 - 91)
Source: pfam

Nucleos_tra2_C

Nucleos_tra2_C (PF07662.13)

Description: Na⁺ dependent nucleoside transporter C-terminus
Coordinates: 218 - 420 (alignment region 219 - 420)
Source: pfam

Figura 42. Análise de domínios proteicos em transportador de nucleosídeos de *A. brasilense*, PZP41335.1, através de ferramenta de bioinformática Pfam.

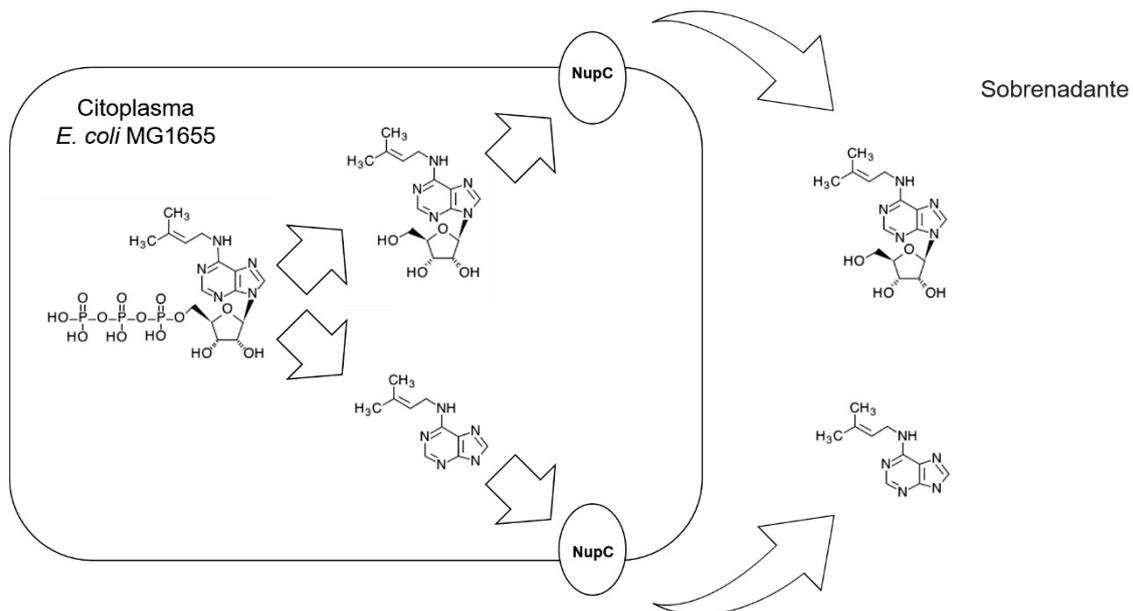


Figura 43. Hipótese sobre excreção de citocininas produzidas em *E. coli* recombinante.

Legenda. 1) NupC: transportador de purina de *E. coli* MG1655.

4.7. Atividade biológica de citocininas produzidas por *E. coli* recombinante em plantas

No período de tempo em que a produção de citocininas sob controle de promotores induzíveis estava sendo estudada (Figura 21 da Seção 4.4 e Figura 36 da Seção 4.6), foi realizada parceria com a professora Carem G. V. Rechia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) para testar a fração citosólica das bactérias recombinantes pKt_{mr} e pKt_{pt} como possíveis substitutos à citocinina sintética (BAP) na formação de calos de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Figura 44). Observou-se que a esta fração de bactéria selvagem (MG1655wt; Figura 44A) não aumentou a massa celular e houve oxidação das células, enquanto que nos tratamentos realizados com a fração citosólica das bactérias recombinantes houve aumento da massa celular em diferentes proporções (Figuras 44C e 44D) de forma análoga aos experimentos tratados com citocinina sintética BAP (Figura 45B). Uma vez que citocininas fosforiladas (tZRMP) aplicadas de forma exógena possuem tanta atividade biológica em plantas quanto suas respectivas formas ativas (tZ) (SPÍCHAL et al., 2004), tais resultados reforçam a observação anterior de que ainda há citocininas fosforiladas no citoplasma das bactérias recombinantes. Como a formação de calo em técnicas de micropropagação é dependente da presença de citocininas no meio de cultura (OSHCHEPKOV et al., 2020), concluiu-se que as citocininas produzidas por bactérias expressando as enzimas T_{mr} e I_{pt4} possuem atividade biológica.

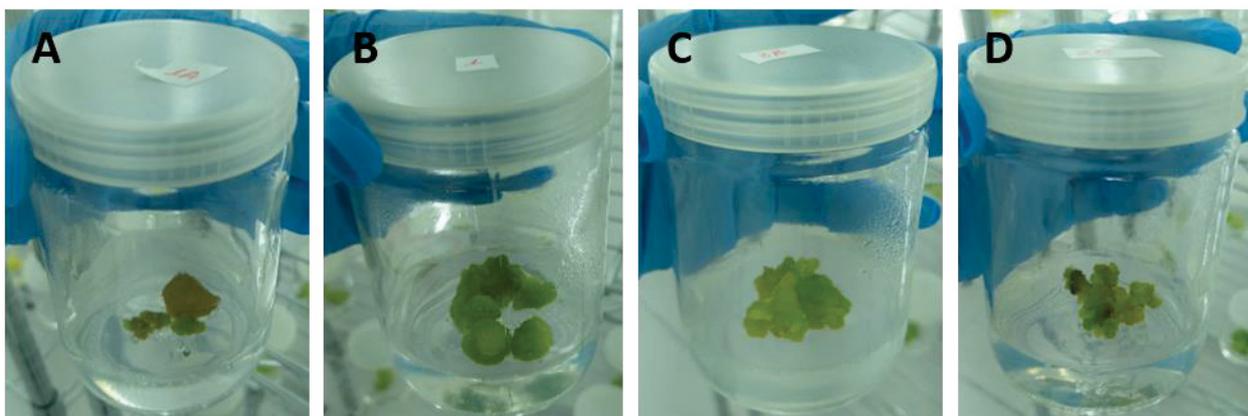


Figura 44. Produção de calo de *Solanum lycopersicum* usando citocinina comercial e produzida por *E. coli* recombinante.

Legenda. A) *Solanum lycopersicum* cultivado com fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655wt + AIA (controle negativo). B) *Solanum lycopersicum* cultivado com BAP + AIA (controle positivo). C) *Solanum lycopersicum* cultivado com fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pKtmr + AIA. D) *Solanum lycopersicum* cultivado com fração solúvel do citosol de *E. coli* MG1655 pKipt + AIA.

Os resultados obtidos com a indução de calo de tomate (*Solanum lycopersicum*) por citocininas produzidas por bactérias recombinantes demonstram que as citocininas produzidas por essas bactérias podem ser utilizadas como substitutos de citocininas sintéticas em cultivos de tecidos vegetais. Tal prova de conceito mostra que os circuitos genéticos caracterizados nessa Tese possuem grande potencial biotecnológico: a possibilidade de produzir citocininas em larga escala permite baratear as tecnologias atuais de cultivo de células vegetais, além de remover um gargalo no aumento de escala dessas tecnologias e no desenvolvimento de tecnologias futuras que dependam do uso de fitohormônios.

5. Análise Crítica da Tese

Iniciarei a análise crítica no meu próprio trabalho com uma confissão: esse trabalho é incrivelmente complexo e desafiador, mesmo que na superfície pareça ser algo simples. Boa parte dessa impressão inicial de simplicidade (a meu ver) se deve ao fato de que a literatura sobre o assunto é vasta. Ledo engano.

Tive muitas dificuldades em questão de literatura e, conseqüentemente, de metodologia. Parece contraditório eu dizer que a literatura sobre o assunto é vasta e depois apontar que não tinha literatura disponível para me guiar... até você perceber que toda a literatura está toda voltada para descrever plantas. Mesmo quando se trata de microrganismos naturalmente produtores de citocininas, quase não há descrição sobre eles na literatura. Conseqüentemente, nas muitas vezes que eu obtinha um resultado ao qual não conseguia explicar, eu não tinha literatura para recorrer. Minha única saída era formular hipóteses e pôr essas ideias à prova, até encontrar um resultado que explicasse a observação anterior. É como navegar no escuro.

Conseqüentemente, essa dificuldade também se refletiu na metodologia. Toda a literatura está voltada para extração, purificação e caracterização de citocininas presentes em tecidos vegetais, e parte desses métodos não é adaptável para o sistema de produção de citocininas desenvolvido nessa Tese. O exemplo mais emblemático desse problema foram os protocolos de análise em LC-MS: como as citocininas predominantes em tecidos vegetais são nucleobases e nucleosídeos e os poucos nucleotídeos estão na forma monofosforilada, faz todo sentido realizar a análise de LC-MS em modo positivo. Entretanto, quando se trata dos extratos livres das bactérias recombinantes, em virtude das citocininas serem muito mais polares por estarem di- ou trifosforiladas, faz mais sentido usar essa técnica no modo negativo, ao qual não existe protocolo específico para citocininas na literatura. Mais tarde, encontrei um protocolo promissor para análise de nucleotídeos em LC-MS em modo negativo (STRZELECKA et al., 2017), mas descobri da pior forma possível que nem todo protocolo pode ser aplicado aos equipamentos existentes no laboratório: o tampão de corrida entupiu o equipamento, e os resultados que consegui obter com essa metodologia não foram aproveitáveis.

Outros problemas de metodologia envolveram a tentativa de identificação da molécula produzida pelas bactérias recombinantes. Mesmo tendo literatura abundante em relação à identificação de citocininas por métodos sensíveis como ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa, as citocininas presentes no sobrenadante das bactérias recombinantes (que em teoria seriam mais fáceis de caracterizar por serem similares às existentes nos tecidos vegetais) se provaram difíceis de identificar por esses métodos, o que é frustrante.

As dificuldades de metodologia também estiveram presentes no bioensaio. Apesar de ser uma metodologia simples e ter sido muito útil para o andamento desse trabalho, o método é surpreendentemente trabalhoso e demorado, especialmente quando há muitas amostras para se analisar (que era a norma na maior parte das vezes). Trocar o gene repórter para proteínas fluorescentes ou luminescentes agilizariam em muito a análise, uma vez que bastaria apenas a leitura em microplaca para obter o resultado desejado, ao invés de realizar múltiplos ensaios enzimáticos. De quebra, também sanaria o problema de interferências por artefatos gerados pela bactéria que está expressando o sistema de produção de citocininas, como visto no decorrer dessa Tese.

Apesar de todas as dificuldades, eu realmente gostei de trabalhar nessa linha de pesquisa e, na minha opinião, a biologia sintética é uma área fantástica. As ferramentas desenvolvidas para construir os circuitos genéticos facilitam muito a vida do pesquisador: ter diversas partes genéticas à sua disposição simplifica em muito a tarefa de projetar múltiplos circuitos genéticos, e o fato das clonagens serem modulares e direcionadas poupa um tempo precioso para construir esses circuitos. Sem essas ferramentas, acredito que teria sido muito mais complicado desenvolver os mesmos circuitos genéticos que construí nessa Tese; o planejamento e trabalho para montar os mesmos circuitos seria muito maior.

Em relação aos resultados obtidos nessa Tese, acredito que esses são de grande valia para a biotecnologia vegetal. Uma das técnicas que se beneficia dos achados desse trabalho é a micropropagação vegetal: o barateamento do reagente mais caro (citocinina) não só beneficia a pesquisa básica tornando a técnica mais acessível, como permite que a técnica seja aplicada em maior

escala. Isso beneficia também cultivos de plantas ornamentais, exóticas e ameaçadas de extinção que são difíceis de cultivar.

Outra área que se beneficia com o circuito genético desenvolvido nessa Tese é a agricultura. Há uma urgente necessidade de aumentar a produtividade das lavouras em até 50% até a metade desse século sem comprometer metas ambientais (FAO, 2017). A saída mais viável é melhorar a produtividade nas áreas existentes, uma vez que expandir áreas de plantio invariavelmente incorre em avançar em áreas de preservação ambiental. Nesse ponto, baratear a produção de citocininas naturais permite que essas moléculas sejam usadas em larga escala como biofertilizantes. Tal abordagem é mais vantajosa do que o uso de fertilizantes químicos, uma vez que esses acabam colaborando com o efeito estufa pelo fato do conteúdo nitrogenado não aproveitado pelas plantas eventualmente se converter em óxido nitroso.

Além do potencial de substituir fertilizantes químicos, a implementação em alta escala de citocininas tem o potencial de ajudar tecnologias emergentes para aumentar a produção de alimentos como a jardinagem vertical. Essa tecnologia tem como princípio o cultivo de plantas através de hidroponia em prédios. Apesar de vantagens intrínsecas como a maior variedade de culturas e o espaço reduzido para plantio, a técnica também apresenta desafios como a falta de exposição das plantas à luz solar e o alto custo para manutenção de condições controladas como umidade e temperatura. O uso de citocininas permite, além de melhorar o crescimento e produtividade das plantas, aumentar a resistência dos cultivares a stress abiótico, o que permite que as condições de cultivo sejam menos rígidas e assim potencialmente pode mitigar os gargalos enfrentados por essa abordagem de produção de alimentos.

6. Conclusão

Nessa tese caracterizou-se a produção heteróloga de citocininas em *E. coli* MG1655. Demonstrou-se que a via de biossíntese é funcional nesse chassi de expressão, e que enzimas do citosol interagem com o produto da reação enzimática das enzimas Tmr e lpt4 e facilitam o transporte desses produtos para o exterior celular, que provavelmente é feito através de transportadores de purinas. Também se descobriu que tanto o sobrenadante como a biomassa dessas bactérias contém citocininas, o que é interessante do ponto de vista industrial. Demonstrou-se também que o produto dessas bactérias possui atividade biológica e podem ser usados para propósitos biotecnológicos. Não foi possível ou não conseguimos identificar a estrutura molecular da citocinina produzida.

7. Perspectivas

Há várias áreas para explorar a partir dos resultados dessa Tese. Uma dessas frentes é continuar os testes de atividade biológica, especialmente usando o sobrenadante das bactérias recombinantes. Há implicações industriais caso seja comprovado que citocininas excretadas pelas bactérias recombinantes também possuem atividade biológica: processos na qual o produto desejado é excretado para o exterior celular são mais simples (e conseqüentemente mais baratos), além de permitirem cultivos em regime contínuo; além disso, o fato das citocininas presentes no citosol também serem biologicamente ativas implica que a biomassa gerada no processo pode ser usada como produto também (em geral a biomassa é considerada um resíduo, que inclusive é gerado em altas quantidades). Isso permitiria a produção de citocininas em larga escala e a custos reduzidos.

Uma segunda frente de pesquisa seria a identificação da molécula produzida pelas bactérias recombinantes: essa informação é crucial para que seja possível purificar a molécula e conseqüentemente produzir citocininas puras para pesquisa, em larga escala.

Uma terceira linha de trabalho seria a otimização do processo de produção de citocininas. Uma abordagem interessante seria a otimização do circuito genético, que envolveria 1) testar o comportamento dos genes *tmr/IPT4* sob controle de promotores com características não avaliadas nessa Tese; 2) adicionar o repressor LacI expresso constitutivamente nos circuitos genéticos envolvendo promotores induzíveis por lactose, para obter um controle de expressão mais fino do sistema; 3) adicionar uma via metabólica adicional para produção de DMAPP/HMBDP; 4) identificar as enzimas que interagem com as citocininas produzidas pelas enzimas Tmr e Ipt4; e 5) otimizar a secreção das citocininas presentes no citosol das bactérias recombinantes. Após a otimização do circuito genético, seria interessante otimizar os parâmetros do processo como meio de cultura e condições de cultivo, e por fim escalonar do processo para reator.

Uma quarta linha de pesquisa interessante é a otimização do sistema de detecção de citocininas, substituindo o gene repórter da bactéria sensora KMI001 para um gene que não seja nativo em *E. coli* e seja fácil de detectar.

Para esse fim, proteínas fluorescentes (GFP, RFP, YFP, CFP) ou um sistema que produza luminescência (Lux) são ótimas candidatas. Essas proteínas simplificariam a análise, eliminando a etapa de ensaio enzimático que é requerida no processo atual. Além disso, permitiriam medir com precisão a quantidade de citocininas não-fosforiladas de uma amostra sem a preocupação do resultado apresentar artefatos que possam interferir na análise.

Uma última linha de pesquisa que pode ser derivada dos resultados obtidos nessa Tese é a transferência do circuito genético para bactérias promotoras de crescimento vegetal, como *A. brasilense*, para que a citocinina produzida pelo circuito seja entregue *in locu* para as plantas. Nesse sentido, também seria necessário otimizar os códons dos genes *tmr* e IPT4 para serem expressos nessas bactérias, assim como usar promotores de expressão gênica compatíveis com essas bactérias.

8. Referências Bibliográficas

AINALIDOU, A.; TANOU, G.; BELGHAZI, M.; et al. Integrated analysis of metabolites and proteins reveal aspects of the tissue-specific function of synthetic cytokinin in kiwifruit development and ripening. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 318–333, 2016.

AKIYOSHI, D. E.; KLEE, H.; AMASINO, R. M.; NESTER, E. W.; GORDON, M. P. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 19, p. 5994–5998, 1984.

ARGUESO, C. T.; RAINES, T.; KIEBER, J. J. Cytokinin signaling and transcriptional networks. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 5, p. 533–539, 2010.

ASHIHARA, H.; STASOLLA, C.; FUJIMURA, T.; CROZIER, A. Purine salvage in plants. **Phytochemistry**, v. 147, p. 89–124, 2018.

ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; et al. Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. **Science**, v. 309, n. 5375, p. 741–745, 2005.

BARRY, G. F.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T.; BRAND, L. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 15, p. 4776–4780, 1984.

BLATTNER, F. R.; III, G. P.; BLOCH, C. A.; et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453–1462, 1997.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; LUNA, V. Basic and Technological Aspects of Phytohormone Production by Microorganisms: *Azospirillum* sp. as a Model of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: D. K. Maheshwari (Ed.); **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management**. p.141–182, 2011. Springer, Berlin, Heidelberg.

CASTILLO, P.; MOLINA, R.; ANDRADE, A.; et al. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. In: F. Cassán; Y. Okon; C. Creus (Eds.); **Handbook for Azospirillum**. p.115–138, 2015. Springer, Cham.

CHAN, W.; VERMA, C. S.; LANE, D. P.; GAN, S. K. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia*

coli. **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, p. 931–937, 2013.

CHU, H.; KO, T.; WANG, A. H. Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 5, p. 1738–1748, 2010.

CIURA, J.; KRUK, J. Phytohormones as targets for improving plant productivity and stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 229, p. 32–40, 2018.

ELOWITZ, M. B.; LEIBLER, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. **Nature**, v. 403, p. 335–338, 2000.

ENGLER, C.; KANDZIA, R.; MARILLONNET, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. **PLoS One**, v. 3, n. 11, 2008.

EUROPEAN COMMISSION SCIENTIFIC COMMITTEES. **Opinion on Synthetic Biology I: Definition**. Publications Office of the European Union, 2014.

FAO. **The future of food and agriculture – Trends and challenges**. Rome, 2017.

GARDNER, T. S.; CANTOR, C. R.; COLLINS, J. J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 403, p. 339–342, 2000.

GHOSH, A.; AHAD, N.; SULTANA, Z.; et al. Evolutionary variation and expression profiling of Isopentenyl transferase gene family in *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. **Plant Gene**, v. 15, p. 15–27, 2018.

GU, J.; LI, Z.; MAO, Y.; et al. Roles of nitrogen and cytokinin signals in root and shoot communications in maximizing of plant productivity and their agronomic applications. **Plant Science**, v. 274, p. 320–331, 2018.

HA, S.; VANKOVA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L.-S. P. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 3, p. 172–179, 2012.

HELM, M.; ALFONZO, J. D. Posttranscriptional RNA Modifications: Playing Metabolic Games in a Cell's Chemical Legoland. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 2, p. 174–185, 2014.

HUSSAIN, A.; ULLAH, I.; HASNAIN, S. Microbial Manipulation of Auxins and Cytokinins in Plants. In: T. Dandekar; M. Naseem (Eds.); **Auxins and Cytokinins in Plant Biology. Methods in Molecular Biology**. v. 1569, p.61–72, 2017. New York, NY: Humana Press.

HWANG, I.; SHEEN, J.; MÜLLER, B. Cytokinin Signaling Networks. **Annual**

Review of Plant Biology, v. 63, p. 353–380, 2012.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. **Nature**, v. 409, p. 1060–1063, 2001.

JAMESON, P. E. Cytokinins. In: B. Thomas; B. G. Murray; D. J. Murphy (Eds.); **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. 2nd ed., v. 1, p.1000–1011, 2017. Academic Press.

JISKROVÁ, E.; KUBALOVÁ, I.; IKEDA, Y. What turns on and off the cytokinin metabolisms and beyond. In: P. Poltronieri; Y. Hong (Eds.); **Applied Plant Genomics and Biotechnology**. p.17–34, 2015. Woodhead Publishing.

KAMADA-NOBUSADA, T.; SAKAKIBARA, H. Molecular basis for cytokinin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 444–449, 2009.

KAMÍNEK, M.; MOTYKA, V.; VAŇKOVÁ, R. Regulation of cytokinin content in plant cells. **Physiologia Plantarum**, v. 101, n. 4, p. 689–700, 1997.

KNIGHT, T. Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. **MIT Libraries**, p. 1–11, 2003.

KOPRNA, R.; DIEGO, N. DE; DUNDÁLKOVÁ, L.; SPÍCHAL, L. Use of cytokinins as agrochemicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 484–492, 2016.

KUROHA, T.; TOKUNAGA, H.; KOJIMA, M.; et al. Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 21, n. 10, p. 3152–3169, 2009.

LEVINE, R. A.; TAYLOR, M. W. Mechanism of Adenine Toxicity in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 3, p. 923–930, 1982.

LIU, S.; CHEN, W.; FANG, K.; JIANG, X.; GAI, Y. Classification and characterization of unknown cytokinins into essential types by in-source collision-induced dissociation electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 17, p. 2075–2082, 2012.

MACDONALD, I. C.; DEANS, T. L. Tools and applications in synthetic biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, p. 20–34, 2016.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.

MIYAWAKI, K.; TARKOWSKI, P.; MATSUMOTO-KITANO, M.; et al. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA

isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 44, p. 16598–16603, 2006.

MULHARDT, C. **Molecular Biology and Genomics**. Academic Press, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

NATIONAL ACADEMY OF ENGINEERING AND NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Positioning Synthetic Biology to Meet the Challenges of the 21st Century: Summary Report of a Six Academies Symposium Series**. The National Academies Press, 2013.

NØRHOLM, M. H. H. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. **BMC Biotechnology**, v. 10, n. 21, p. 1–7, 2010.

NOVÁK, O.; ANTONIADI, I.; LJUNG, K. High-Resolution Cell-Type Specific Analysis of Cytokinins in Sorted Root Cell Populations of *Arabidopsis thaliana*. In: J. Kleine-Vehn; M. Sauer (Eds.); **Plant Hormones. Methods in Molecular Biology**. v. 1497, p.231–248, 2017. Springer New York.

NOVÁK, O.; TARKOWSKI, P.; TARKOWSKÁ, D.; et al. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 207–218, 2003.

NYGAARD, P. Functioning of purine salvage pathways. In: M M Müller; E. Kaiser; J. E. Seegmiller (Eds.); **Purine Metabolism in Man—II. Advances in Experimental Medicine and Biology**. p.186–195, 1977. Springer.

O'BRIEN, J. A.; BENKOVÁ, E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 451, p. 1–11, 2013.

OSHCHEPKOV, M. S.; KALISTRATOVA, A. V; SVELIEVA, E. M.; et al. Natural and synthetic cytokinins and their applications in biotechnology, agrochemistry and medicine. **Russian Chemical Reviews**, v. 89, n. 8, p. 787–810, 2020.

PATCHING, S. G.; BALDWIN, S. A.; BALDWIN, A. D.; et al. The nucleoside transport proteins, NupC and NupG, from *Escherichia coli*: specific structural motifs necessary for the binding of ligands. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 462–470, 2005.

PERSSON, B. C.; ESBERG, B.; ÓLAFSSON, Ó.; BJÖRK, G. R. Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. **Biochimie**, v. 76, n. 12,

p. 1152–1160, 1994.

PLÍHALOVÁ, L.; VYLÍČILOVÁ, H.; DOLEŽAL, K.; et al. Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. **New Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 614–624, 2016.

POWELL, A. F.; PALECZNY, A. R.; OLECHOWSKI, H.; EMERY, R. J. N. Changes in cytokinin form and concentration in developing kernels correspond with variation in yield among field-grown barley cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 64, p. 33–40, 2013.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 431–449, 2006.

SAKAKIBARA, H.; KASAHARA, H.; UEDA, N.; et al. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 28, p. 9972–9977, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

SEO, H.; KIM, S.; SAGONG, H.-Y.; et al. Structural basis for cytokinin production by LOG from *Corynebacterium glutamicum*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 31390, p. 1–9, 2016.

SHAPIRA, P.; KWON, S.; YOUTIE, J. Tracking the emergence of synthetic biology. **Scientometrics**, v. 112, n. 3, p. 1439–1469, 2017.

SHETTY, R. P.; ENDY, D.; KNIGHT, T. F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Journal of Biological Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1–12, 2008.

SLUSARCZYK, A. L.; LIN, A.; WEISS, R. Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 406–420, 2012. Nature Publishing Group.

SMALL, C. C.; DEGENHARDT, D. Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation : A review. **Ecological Engineering**, v. 118, p. 43–51, 2018.

SMOLKE, C. D. Building outside of the box: iGEM and the BioBricks Foundation. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 1099–1102, 2009.

SPÍČHAL, L. Bacterial Assay to Study Plant Sensor Histidine Kinases. In: N.

Dissmeyer; A. Schnittger (Eds.); **Plant Kinases: Methods and Protocols**. v. 779, p.139–147, 2011. Humana Press.

SPÍCHAL, L.; RAKOVA, N. Y.; RIEFLER, M.; et al. Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 9, p. 1299–1305, 2004.

SPRINZAK, D.; ELOWITZ, M. B. Reconstruction of genetic circuits. **Nature**, v. 438, p. 443–448, 2005.

STIRK, W. A.; STADEN, J. VAN. Flow of cytokinins through the environment. **Plant Growth Regulation**, v. 62, p. 101–116, 2010.

STRZELECKA, D.; CHMIELINSKI, S.; BEDNAREK, S.; JEMIELITY, J.; KOWALSKA, J. Analysis of mononucleotides by tandem mass spectrometry: investigation of fragmentation pathways for phosphate- and ribose-modified nucleotide analogues. **Scientific Reports**, v. 7, n. 8931, p. 1–12, 2017.

SUGAWARA, H.; UEDA, N.; KOJIMA, M.; et al. Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2734–2739, 2008.

SUZUKI, T.; MIWA, K.; ISHIKAWA, K.; et al. The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 2, p. 107–113, 2001.

TAKEDA, S.; FUJISAWA, Y.; MATSUBARA, M.; AIBA, H.; MIZUNO, T. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC → YojN → RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 440–450, 2001.

TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; SUGIYAMA, T. Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 26405–26410, 2001.

TO, J. P. C.; KIEBER, J. J. Cytokinin signaling: two-components and more. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 2, p. 27–30, 2008.

UCINI, A. The promise and perils of synthetic biology. **The Economist**, 4. Apr. 2019.

VOIGT, C. A. Synthetic biology 2020 – 2030: six commercially-available products that are changing our world. **Nature Communications**, v. 11, n. 6379, p. 1–6,

2020.

WANNER, B. L.; KODAIRA, R.; NEIDHARDT, F. C. Regulation of lac Operon Expression: Reappraisal of the Theory of Catabolite Repression. **Journal of Bacteriology**, v. 136, n. 3, p. 947–954, 1978.

WEAVER, M. The engineering of living organisms could soon start changing everything. **The Economist**, 4. Apr. 2019.

WILLIAMS, S. G.; CRANENBURGH, R. M.; WEISS, A. M. E.; et al. Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 9, p. 2120–2124, 1998.

WISNER, S. Synthetic Biology Investment Reached a New Record of Nearly \$8 Billion in 2020 — What Does This Mean For 2021? **Synbiobeta**, 27. Jan. 2021.

YAGIL, E.; BEACHAM, I. R. Uptake of Adenosine 5'-Monophosphate by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 121, n. 2, p. 401–405, 1975.

YAMAGUCHI, I.; COHEN, J. D.; CULLER, A. H.; et al. Plant Hormones. In: H.-W. (Ben) Liu; L. Mander (Eds.); **Comprehensive Natural Products II**. p.9–125, 2010. Elsevier Ltd.

ZALABÁK, D.; POSPÍŠILOVÁ, H.; ŠMEHILOVÁ, M.; et al. Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 1, p. 97–117, 2013.

ZALEWSKI, W.; GALUSZKA, P.; GASPARIS, S.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. Silencing of the HvCKX1 gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 6, p. 1839–1851, 2010.

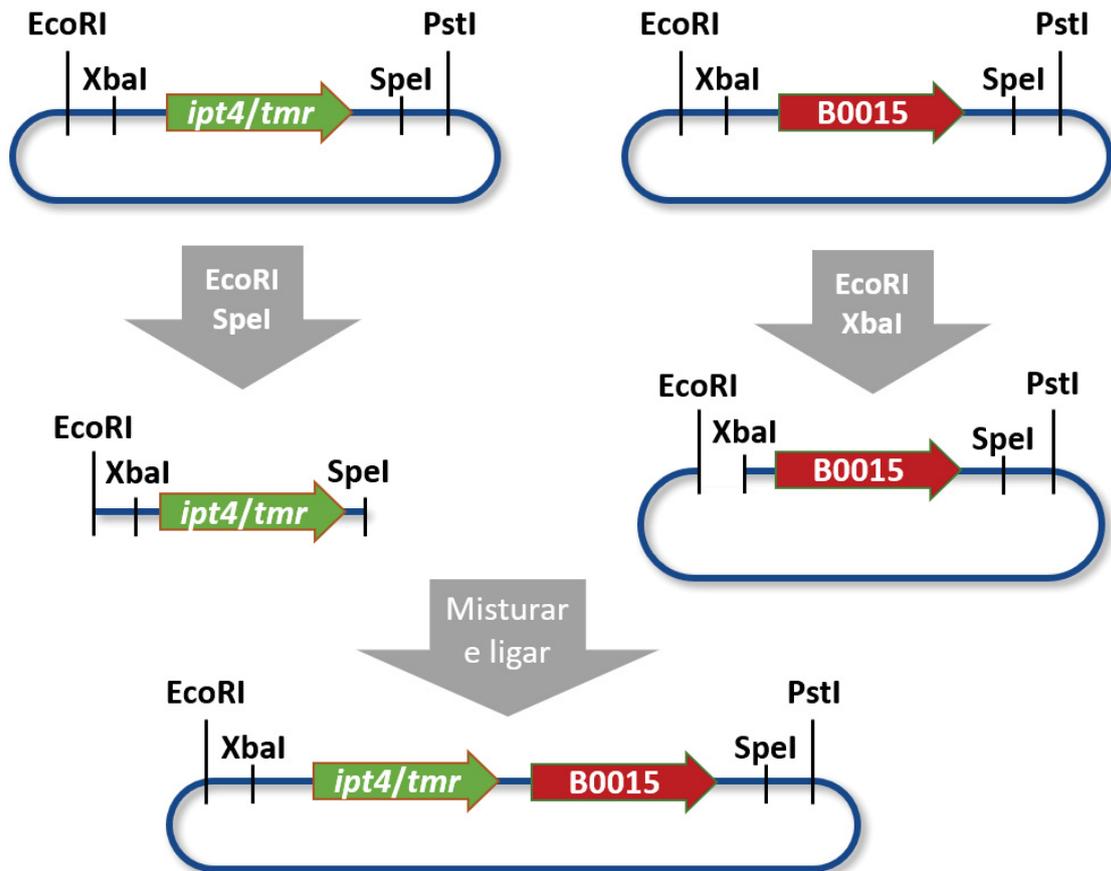
ZHANG, K.; NOVAK, O.; WEI, Z.; et al. Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. **Nature Communications**, v. 5, n. 3274, p. 1–12, 2014.

ZÜRCHER, E.; MÜLLER, B. Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function — Advances and New Insights. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 324, p. 1–38, 2016.

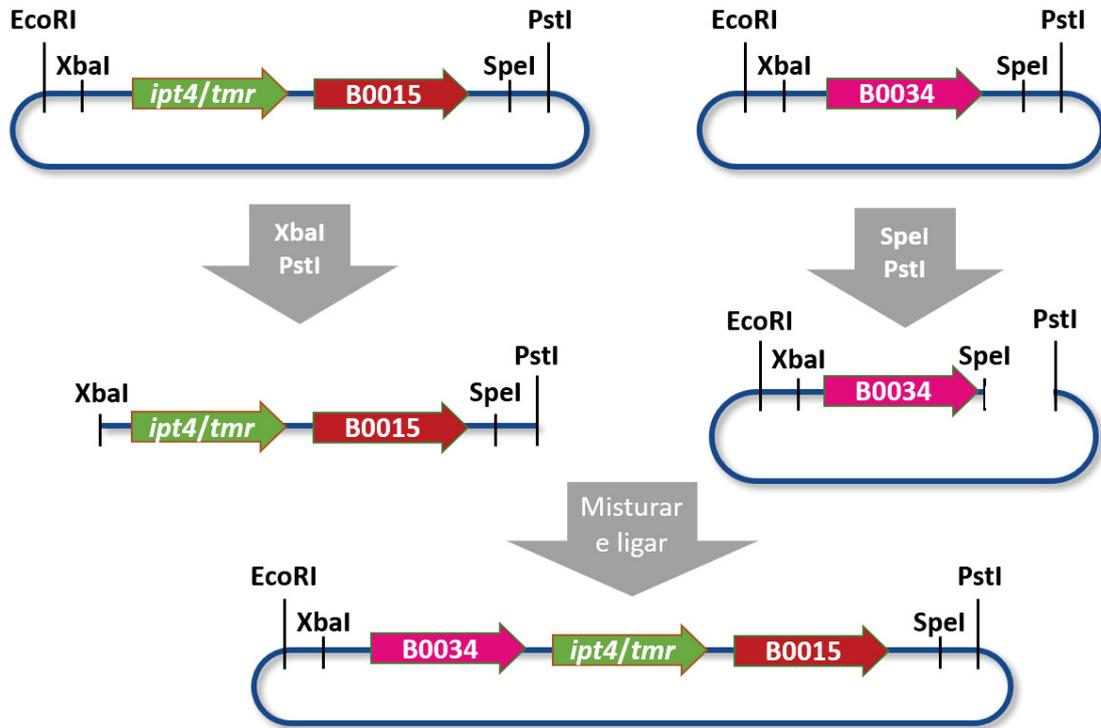
9. Anexos

9.1. Construção dos plasmídeos através do sistema Biobricks

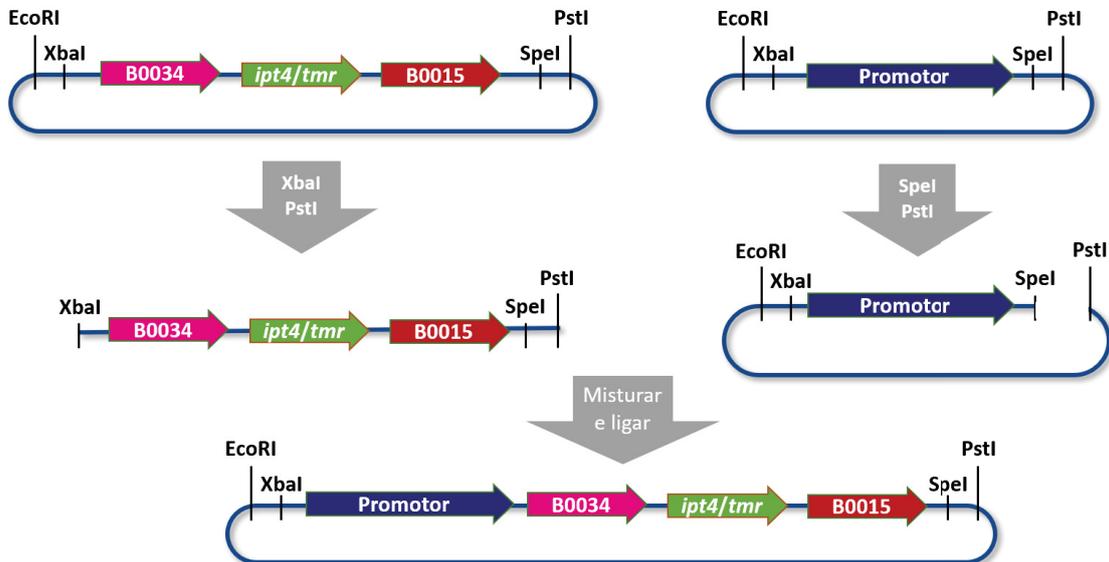
Etapa 1. Clonagem do terminador duplo (BBa_B0015) *downstream* aos genes *tmr*/IPT4.



Etapa 2. Clonagem do sítio de ligação de ribossomo (BBa_0034) *upstream* aos genes *tmr*/IPT4.



Etapa 3. Clonagem dos promotores *upstream* aos genes *tmr*/IPT4.



9.2. Composição de tampões usados em reação de PCR

Tabela 19. Composição do Buffer XF (10x concentrado)

Componente	Concentração
Tris-HCl pH 8,8	200 mM
KCl	100 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	60 mM
Albumina de soro bovino (BSA)	1 mg/mL
Triton X-100	1%

Fonte: NØRHOLM, 2010.