



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENAN JOSÉ CASAROTTO APPEL

**“PREDIÇÃO, ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE RNAS NÃO
CODIFICADORES (ncRNAs) EM *Bacillus thuringiensis*”**

RENAN JOSÉ CASAROTTO APPEL

**“PREDIÇÃO, ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE RNAS NÃO
CODIFICADORES (ncRNAs) EM *Bacillus thuringiensis*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Gislayne Trindade Vilas-Boas.

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL.

Appel, Renan José Casarotto.

Predição, análise e validação de RNAs não codificadores (ncRNAs) em *Bacillus thuringiensis* / Renan José Casarotto Appel. - Londrina, 2018.
102 f. : il.

Orientador: Gislayne Trindade Vilas-Boas.

Coorientador: Rogério Fernandes de Souza.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Bioinformática - Tese. 2. Regulação gênica - Tese. 3. Controle biológico - Tese. I. Vilas-Boas, Gislayne Trindade. II. de Souza, Rogério Fernandes. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

RENAN JOSÉ CASAROTTO APPEL

**PREDIÇÃO, ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE RNAs NÃO
CODIFICADORES (ncRNAs) EM *Bacillus thuringiensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Gislayne Trindade Vilas-Boas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Ana Paula Scaramal Ricietto
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 28 de junho de 2018

DEDICATÓRIA

A todos que acreditaram na realização deste ideal, dedico.

AGRADECIMENTOS

Grato a Deus por seu amor infinito, seu fôlego de vida em mim deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Agradeço à minha mãe Irma, meu maior exemplo. Obrigado por cada incentivo e puxão de orelha, pelas orações em meu favor, e principalmente pela preocupação para que eu estivesse sempre andando pelo caminho correto. A você, o meu maior agradecimento.

Ao meu irmão Ronaldo, por sempre acreditar em meus sonhos, e não poupar esforços para que eu concluísse mais uma etapa de minha vida.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Gislayne Trindade Vilas-Boas, por exigir de mim muito mais do que eu supunha ser capaz de fazer, obrigado pela confiança, dedicação, empatia e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas por seus ensinamentos, paciência e confiança. Agradeço pela pessoa e profissional extraordinários que você é.

Ao Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza por todos ensinamentos, disponibilidade e correções.

Aos professores Dra. Fernanda Aparecida Pires Fazon, Dr. Fernando Gomes Barcellos, Dra. Elisete Pains Rodrigues e Dra. Ana Paula Scaramal Ricietto pelas contribuições e correções.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por me oportunizarem um aperfeiçoamento de excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro à pesquisa.

A todos do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias e do Laboratório de Bioinformática por estarem sempre presentes me auxiliando, ensinando e acima de tudo apoiando durante a pesquisa. Foi um privilégio trabalhar ao lado de vocês.

Aos meus amigos, pelas alegrias e tristezas compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro melhoram tudo o que tenho produzido na vida.

Minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

APPEL, Renan José Casarotto. **Predição, análise e validação de RNAs não codificadores (ncRNAs) em *Bacillus thuringiensis***. 2018. 102f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A visão clássica do dogma central da biologia molecular passou por mudanças de paradigma na virada deste século, quando avanços, principalmente em análises de bioinformática, contribuíram para a descoberta de que muito do que era transcrito nos organismos eram regiões não traduzidas em proteínas, e que apresentariam função biológica. Tais transcritos foram denominados como RNAs não codificadores (ncRNAs). Motivados por tais descobertas, novos métodos computacionais dedicados à ncRNAs foram propostos, possibilitando estudos de ocorrência e distribuição em genomas de diversos microrganismos. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), uma bactéria com características entomopatogênicas, é utilizada em todo o mundo no controle de pragas e vetores de doenças e ainda não foi analisada com respeito a estas moléculas. A maioria dos processos ligados à virulência, capacidade necrotrófica e esporulação desta bactéria dependem de sistemas *quorum sensing*, porém, estas vias não estão totalmente elucidadas e ncRNAs podem estar atuando junto às mesmas. Desta forma, este trabalho objetivou identificar, analisar e validar ncRNAs em três linhagens dessa espécie. As sequências completas de cromossomos e plasmídeos dos genomas das linhagens Bt407, HD-1 e HD73 foram selecionados. Ao todo, foram identificados 27.111 possíveis ncRNAs; sendo 1.874 candidatos considerados significativos, distribuídos em 177 famílias distintas encontradas principalmente em regiões presentes nas três linhagens. As moléculas identificadas estão envolvidas em processos regulatórios complexos principalmente relacionados à virulência, patogenicidade, resistência e sobrevivência da bactéria. A família *epsC* teve sua expressão validada no genoma. Os resultados alcançados evidenciam que mesmo bactérias muito relacionadas filogeneticamente podem apresentar diferentes respostas às modificações ambientais, apresentando diferentes padrões de expressão; e ainda levam a uma nova linha de investigação para a compreensão de mecanismos fisiológicos em *B. thuringiensis*.

Palavras-chave: Bioinformática. Regulação gênica. Controle biológico.

APPEL, Renan José Casarotto. **Predição, análise e validação de RNAs não codificadores (ncRNAs) em *Bacillus thuringiensis***. 2018. 102p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The classic view of the central dogma of molecular biology has undergone paradigm shifts at the turn of this century, when advances, especially in bioinformatics analyzes, have contributed to the discovery that much of what was transcribed in organisms was regions not translated into proteins, and would have biological function. These transcripts were designated as non-coding RNAs (ncRNAs). Motivated by such discoveries, new computational methods dedicated to the ncRNAs were proposed, enabling the occurrence and distribution studies in genomes of several microorganisms. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a bacterium with entomopathogenic characteristics, is used worldwide in the control of pests and disease vectors and has not been analyzed with respect to these molecules. Most of the processes related to the virulence, necrotrophism and sporulation of this bacterium depend on quorum sensing systems, however, these pathways are not elucidated and ncRNAs may be acting next to them. In this way, this work aimed to identify, analyze and validate ncRNAs in three strains of this specie. The complete chromosome and plasmid sequences of the genomes of the Bt407, HD-1 and HD73 strains were selected. In all, 27,111 potential ncRNAs; being 1.874 candidates considered significant, distributed in 177 different families found mainly in regions present in the three strains. The molecules identified are involved in complex regulatory processes mainly related to the virulence, pathogenicity, resistance and survival of the bacterium. The epsC family had the expression validated in the genome. The results show that even highly phylogenetically related bacteria may present different responses to environmental modifications, presenting different expression standards; and still lead to a new line of investigation for the understanding of physiological mechanisms in *B. thuringiensis*.

Keywords: Bioinformatics. Gene regulation. Biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Microscopias de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	15
Figura 2 -	Características gerais relacionadas aos plasmídeos das três linhagens selecionadas.	23
Figura 3 -	Representação do funcionamento do sistema hok/sok.	29
Figura 4 -	Representação da distribuição geral das famílias de ncRNAs identificadas nas três linhagens.	64
Figura 5 -	Representação do número de famílias de ncRNAs identificadas em <i>B. thuringiensis</i> linhagens 407, HD-1 e HD73.	72
Figura 6 -	Visualização circular dos genomas de <i>B. thuringiensis</i> analisados, e a localização de seus respectivos ncRNAs identificados.	75
Figura 7 -	Visualização circular dos cromossomos de <i>B. thuringiensis</i> analisados, e a localização de seus respectivos ncRNAs identificados.	77
Figura 8 -	Visualização circular dos plasmídeos de <i>B. thuringiensis</i> analisados, e a localização de seus respectivos ncRNAs identificados.	78
Figura 9 -	Estrutura secundária do ncRNA epsC.	80
Figura 10 -	Representação gráfica da localização do ncRNA epsC nas linhagens de <i>B. thuringiensis</i> Bt407, HD-1 e HD73.	82
Figura 11 -	Representação da localização do ncRNA epsC identificado neste trabalho nas linhagens de <i>B. cereus</i> e <i>B. subtilis</i> avaliadas por IRNOV; WINKLER (2010).	84
Figura 12 -	Expressão relativa do ncRNA epsC identificado nos genomas das linhagens Bt407, HD-1 e HD73 de <i>B. thuringiensis</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens selecionadas e respectivas características genômicas.....	18
Tabela 2 - Proteínas RNPP na regulação biológica do grupo <i>B. cereus lato sensu</i>	25
Tabela 3 - Algumas famílias de ncRNAs identificadas em organismos procariotos e eucariotos, e suas respectivas funções.....	27
Tabela 4 - Ferramentas utilizadas para predição e análise dos ncRNAs.	54
Tabela 5 - Linhagens selecionadas e respectivas identificações de acesso às sequências de seus genomas.	55
Tabela 6 - Famílias de ncRNAs significativos identificadas nas análises dos genomas das linhagens de <i>B. thuringiensis</i> 407, HD-1 e HD-73.....	59
Tabela 7 - Classificação das famílias de ncRNAs segundo a presença nos genomas de <i>B. thuringiensis</i> linhagens 407, HD-1 e HD73.....	71
Tabela 8 - Número de famílias e de sequências de ncRNAs identificados em <i>B. thuringiensis</i> linhagens 407, HD-1 e HD73.	72
Tabela 9 - Características gerais dos ncRNAs identificados nos genomas das linhagens Bt407, HD-1 e HD73 de <i>B. thuringiensis</i>	74
Tabela 10 - ncRNA selecionado e alguns de seus respectivos alvos preditos.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ais	Autoindutores
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Cap	Proteínas de adesão a colágeno
Cry	Proteínas cristalinas
Cyt	Proteínas citolíticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGMs	Elementos genéticos móveis
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR</i>
Fur	Repressor de absorção férrica
g	Grama
kb	Quilobase
LB	Meio de cultura Luria Bertani
log	Fase de crescimento logarítmico
Mb	Megabase
MCP	Proteínas quimiotáticas aceptoras de metil
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanograma
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNAs	RNAs não codificadores
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
ORF	Quadro aberto de leitura
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
PK	Pseudonó

PKS	Mecanismo de morte pós-segregacional
qRT-PCR	PCR de transcrição reversa em tempo real
QS	<i>Quorum sensing</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RBS	Sítio de ligação ao ribossomo
REP-PCR	<i>Repetitive element sequence-based PCR</i>
REST	Ferramenta de <i>software</i> de expressão relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossomal
RNAse	Ribonuclease
RNA _t	RNA de transferência
rpm	Rotações por minuto
SI	Sequências de inserção
Sip	Proteínas inseticidas secretadas
str.	<i>Strain</i>
TA	Sistema toxina-antitoxina
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TEB	Tris-borato EDTA
Tn	Transposons
UFC	Unidade formadora de colônia
UTR	Região não traduzida
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
Vip	Proteínas inseticidas vegetativas
xg	Força gravitacional
β	Beta
δ	Delta
μM	Micromolar
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
1.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.2	GENÔMICA DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
1.2.1	Plasmídeos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
1.3	SISTEMAS DE COMUNICAÇÃO INTRACELULAR DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
1.3.1	Sistema PapR/PlcR	25
1.4	RNAs NÃO CODIFICADORES.....	26
1.4.1	Sistema hok/sok	29
1.4.2	Modo de ação dos ncRNAs	30
1.4.2.1	Cis-RNAs	31
1.4.2.2	Trans-RNAs	31
1.4.2.3	<i>Riboswitches</i>	32
1.4.3	RNAs não codificadores em <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
1.5	BIOINFORMÁTICA E ncRNAs	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
3.	ARTIGO	51
3.1	RESUMO	52
3.2	INTRODUÇÃO.....	53
3.3	METODOLOGIA	54
3.3.1	Softwares: Aplicativos e versões utilizadas	54
3.3.2	Mineração de dados: obtenção das sequências dos genomas	54
3.3.3	Anotação	55

3.3.4	Distribuição das famílias de ncRNAs nos genomas analisados	56
3.3.5	Estudos de expressão	56
3.3.5.1	Seleção do ncRNA	56
3.3.5.2	Predição de alvos do ncRNA.....	56
3.3.5.3	Linhagens de <i>Bacillus thuringiensis</i>	57
3.3.5.4	Extração de RNA total	57
3.3.5.5	Quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA.....	58
3.3.5.6	PCR de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR)	58
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.4.1	Predição e avaliação dos ncRNAs identificados.....	59
3.4.2	Distribuição geral dos ncRNAs nos genomas.....	70
3.4.3	Caracterização do ncRNA selecionado	79
3.4.4	Análises de expressão.....	85
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	 ANEXO 1. Resultados detalhados dos ncRNAs significativos identificados nas análises dos três genomas.	95
	ANEXO 2. Possíveis alvos preditos para o ncRNA epsC na linhagem Bt407.	101
	ANEXO 3. Possíveis alvos preditos para o ncRNA epsC na linhagem HD73.	103

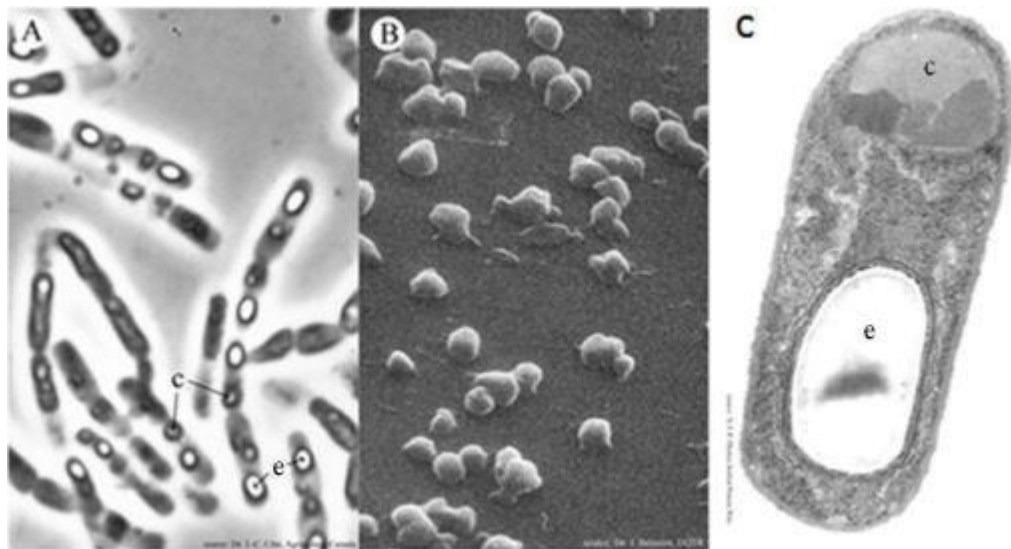
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*Bt*) foi descrito primeiramente no ano de 1915 por Berliner, na Alemanha, tendo sido isolado de lagartas-da-traça de farinha, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (BERLINER, 1915). Embora esta tenha sido a primeira descrição, o primeiro isolamento ocorreu em 1901, quando o pesquisador japonês Ishiwata Shigetane descobriu uma bactéria até então não descrita, como agente causador de uma doença que acometia bichos-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), a qual foi denominada *Bacillus sotto*. Posteriormente, essa foi definida como uma subespécie de *B. thuringiensis* (ROH et al., 2007; ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

Pertencente à família Bacillaceae, que engloba a maioria das espécies formadoras de esporos, esta é um bacilo Gram-positivo com célula vegetativa de 1,0 a 1,2 μm de largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento (FIGURA 1), quimioheterotrófico, resistente a antibióticos β -lactâmicos como a ampicilina e a penicilina e capaz de se movimentar pela presença de flagelos peritríquios (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010; PALMA et al., 2014).

Figura 1. Microscopias de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.



A: Microscopia de contraste de fase de células esporuladas contendo esporos (e) e cristais (c). **B:** Micrografia eletrônica de varredura evidenciando cristais purificados. **C:** Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula evidenciando cristais (c) e esporos (e). **Adaptado de:** LACOURSIÈRE; BOISVERT, 2004.

Ademais, é aeróbia não estrita, com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45 °C e temperatura ótima de 30 °C ± 2 °C (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010; PALMA et al., 2014); cosmopolita, sendo encontrada desde amostras de solo (POLANCZYK; ALVES, 2003; VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004), filoplano (DAMGAARD et al., 1988), em insetos vivos ou mortos (BERNHARD et al., 1997; CHAUFAUX et al., 1997) ou ainda em grãos estocados (MEADOWS et al., 1992).

B. thuringiensis pertence ao grupo *Bacillus cereus lato sensu* cuja classificação apesar de não ser taxonômica, denota um agrupamento de oito espécies intimamente relacionadas entre si (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* e *Bacillus toyonensis*) baseado na similaridade entre as sequências do gene 16S RNAr (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; KLEE et al., 2010; JIMÉNEZ et al., 2013; PATIÑO-NAVARRETE; SANCHIS, 2017), além de outras quatro espécies com proposta de inclusão: *Bacillus wiedmannii* sp. nov. (MILLER et al., 2016), *Bacillus bingmayongensis* sp. nov. (LIU et al., 2014), *Bacillus manliponensis* sp. nov. (JUNG et al., 2011) e *Bacillus gaemokensis* sp. nov. (JUNG et al., 2010). Anteriormente, *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis*, as espécies mais estudadas do grupo, foram classificadas como distintas devido à grande relevância de suas diferenças fenotípicas que eram utilizadas para a classificação do grupo (VILAS-BÔAS, PERUCA; ARANTES, 2007). Até o momento, não há consenso sobre estas serem consideradas espécies separadas ou variantes especializadas de uma única espécie (DREWNOWSKA; ŚWIECICKA, 2013; ŚWIECICKA et al., 2013).

Uma característica típica de *B. thuringiensis* é a produção de cristais proteicos durante a fase de esporulação descoberta somente em 1953 por Hannay (MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 2001; VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; VILAS-BÔAS et al., 2012). Estes cristais são produzidos junto a esporos elipsoidais e localizam-se na região central ou paracentral no interior da célula-mãe, correspondendo de 20% a 30% do peso seco das células (LERECLUS et al., 1989; ARANTES et al., 2002). Eles apresentam atividade entomopatogênica à várias espécies de insetos, destacando as Ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007). Porém, há

subespécies que apresentam cristais tóxicos contra insetos das Ordens Himenoptera, Hemiptera, Orthoptera e Phthrapthera, bem como a alguns nematoides (Strongylida e Tylenchida), protozoários (Diplomonadida) e ácaros (Acari) (FEITELSON; PAYNE; KIM, 1992; SCHNEPF et al., 1998; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; BRAR et al., 2006).

Os cristais produzidos por *Bt* são formados por proteínas cristalinas (Cry) também conhecidas como δ -endotoxinas e proteínas citolíticas (Cyt) (BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007). Entretanto, sua patogenicidade também é atribuída à outras toxinas, como as proteínas inseticidas vegetativas (Vip) e as proteínas inseticidas secretadas (Sip); bem como a fatores de virulência como hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases e exotoxinas (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; VILAS-BÔAS et al., 2012; DE SOUZA LIMA, 2013; PALMA et al., 2014).

Preparações comerciais baseadas em *B. thuringiensis* são muito utilizadas no controle de insetos pragas da agricultura e de vetores de doenças, sendo a comercialização do primeiro produto iniciada em 1938 na França, com o nome de “Sporeine” (BRAR et al., 2006). Em 1950, houve aumento na produção e comercialização destes produtos via implementação de novas tecnologias como o uso de fermentadores, além da descoberta de novas subespécies de *B. thuringiensis*, o que possibilitou ampliar o número de insetos-alvos controlados (BRAR et al., 2006). Em 2010, produtos à base de *Bt* foram responsáveis por cerca de 53% do mercado mundial de bioinseticidas (POLANCZYK; VAN FRANKENHUYZEN; PAULI, 2017).

A principal característica que diferencia os biopesticidas microbianos baseados em *Bt* de outros produtos comercialmente disponíveis é a atividade entomopatogênica específica, ou seja, a maioria dos produtos à base de *B. thuringiensis* apresenta espectro de ação somente a uma ou a poucas espécies de insetos. Ademais, atualmente eles são amplamente reconhecidos como sendo os produtos inseticidas mais seguros e menos prejudiciais para o ambiente, além de não favorecerem a rápida seleção de insetos resistentes, o que acontece frequentemente quando se utiliza inseticidas sintéticos (ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002; ADANG; CRICKMORE E JURAT-FUENTES, 2014; RAYMOND; FEDERICI, 2017).

1.2 GENÔMICA DE *Bacillus thuringiensis*

A sequência genômica de qualquer organismo é um recurso enriquecido de informações para os pesquisadores. As estruturas dinâmicas e funcionais dos genomas, bem como suas características individuais estão sendo reveladas com o progresso de novas análises genômicas, permitindo a descoberta de informações relevantes que ajudam a melhor caracterizá-los e a entender suas relações evolutivas (LIU et al., 2012; WENFEI et al., 2014).

Até maio de 2018, 464 genomas de *Bt* foram depositados no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), dentre os quais 44 apresentam genoma completo e 420 são *drafts* de genomas (genomas com montagens parciais).

Em geral, os genomas de *B. thuringiensis* variam de 5,24 Mb – 6,87 Mb e conteúdo G+C entre 34,63 e 35,48%. Possuem entre 5.343 e 7.265 genes, sendo 4.196 definidos como genes centrais (FANG et al., 2011). A Tabela 1 resume tais características para as três linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas neste trabalho.

Tabela 1. Linhagens selecionadas e respectivas características genômicas.

Linhagens	Tamanho (pb)		Número de Genes	Conteúdo G+C (%)
	Genoma	Cromossomo		
<i>B. thuringiensis</i> 407	6.134.344	5.500.501	6.455	35,02
<i>B. thuringiensis</i> HD-1	6.767.044	5.631.672	6.928	34,92
<i>B. thuringiensis</i> HD73	5.908.575	5.646.799	6.169	35,19

Informações obtidas do banco de dados NCBI.

Diversos estudos têm sugerido que *B. thuringiensis* é uma espécie ecologicamente, fenotipicamente e genomicamente diversa (SAADAOUÏ et al., 2010; GARCÍA et al., 2015; RABINOVITCH et al., 2017). Desta maneira, surgem desafios devido à grande variabilidade encontrada nesta espécie, sendo crucial para a identificação de novas linhagens a aplicação de ferramentas moleculares que possibilitem diferenciá-las de maneira adequada (RABINOVITCH et al., 2017).

Inúmeras técnicas já foram aplicadas para estudar essa diversidade nas linhagens, dentre elas a análise do gene 16S RNAr, considerado um dos principais marcadores moleculares para estudos em diversidade bacteriana (RABINOVITCH et al., 2017). FANG e colaboradores (2011) sequenciaram sete isolados de *B. thuringiensis* utilizando NGS (*Next-Generation Sequencing* – Sequenciamento de

última geração) e, por meio de uma análise filogenética do marcador 16S, notaram uma grande diversidade intraespecífica entre as linhagens.

A análise de regiões repetitivas do genoma também já foi capaz de identificar variações em espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* (RABINOVITCH et al., 2017). SAUKA; BASILE; BENINTENDE (2011), utilizando a técnica de REP-PCR (*Repetitive element sequence-based PCR* – PCR baseada em sequência de elementos repetitivos), e GARCÍA e colaboradores (2015), trabalhando com ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR* – PCR de consenso intergênico repetitivo enterobacteriano), conseguiram identificar variabilidades intraespecíficas em linhagens de *Bt*, possibilitando discriminar isolados provenientes de amostras de diferentes ecossistemas.

Outra técnica considerada uma excelente ferramenta para estudar a variabilidade genética inter e intraespecífica é a tipagem da sequência multilocus (MLST) utilizando genes *housekeeping* (VAN BELKUM, 2003; CARDAZZO et al., 2008; PÉREZ-LOSADA et al., 2013). Esta foi utilizada por WANG e colaboradores (2018) para analisar 158 linhagens de *B. thuringiensis*, onde identificaram alta variabilidade genética entre algumas subespécies; e por ŚWIECICKA e colaboradores (2013) que observaram alta diversidade genética em linhagens isoladas do solo, cujo polimorfismo foi confirmado por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

A técnica de PFGE já foi utilizada em estudos sobre a disseminação de *B. thuringiensis* no ambiente, permitindo identificar diversidade significativa no tamanho do genoma de 14 linhagens (ŚWIECICKA, 2003). No estudo de APAYDIN e colaboradores (2005), o perfil de DNA cromossômico por PFGE deu origem a diferentes padrões de DNA para isolados contendo o mesmo gene *cry*, sugerindo um alto nível de diversidade entre as linhagens de *Bt* analisadas.

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – DNA polimórfico amplificado ao acaso) também possibilitou a diversos autores a detecção de um alto grau de variabilidade entre linhagens. Nos trabalhos de RAI; MESHAM; DONGRE (2009); SAHUKHAL; SHRESTHA; LEKHAK (2009) e SALAMA; EL-GHANY; SAKER (2015), o uso de RAPD-PCR permitiu a identificação de diversas regiões polimórficas discriminatórias para as linhagens de *Bt*.

Todas essas variações em *B. thuringiensis* ocorrem porque esta bactéria pode facilmente trocar ou adquirir materiais genéticos com ou de outras bactérias

através de diversos eventos. Alguns deles são consequência da ação de elementos genéticos móveis (EGMs) que promovem expansões e rearranjos genômicos, possibilitando a transferência horizontal de genes e, assim, apresentando impacto notável na evolução, virulência, patogenicidade e simbiose desses organismos (FANG et al., 2011; BÖHM et al., 2015; HALL; BROCKHURST; HARRISON, 2017; LANG; BEATTY; RICE, 2017; ALVARENGA et al., 2018).

B. thuringiensis abriga uma grande variedade de elementos transponíveis, incluindo sequências de inserção (IS231, IS232, IS240, ISBt1 e ISBt2) e transposons (Tn4430 ou Tn5401), frequentemente associados aos genes *cry* (MAHILLON et al., 1994; LÉONARD; CHEN; MAHILLON, 1997; MISHRA, 2017). O gene *cry1A*, por exemplo, é constantemente encontrado em uma estrutura composta de transposons, flanqueada por IS232 (MENOUE et al., 1990). Além disso, este pode ser organizado em *operons* e/ou co-localizado com outros genes, como os codificadores das proteínas Vip, formando ilhas de patogenicidade inseticida (ARONSON, 1993; MURAWSKA; FIEDORUK; ŚWIECICKA, 2014; ZHU et al., 2015).

Sendo assim, pressupõem-se que estes EGMs dentro da espécie estejam envolvidos na mobilidade dos genes *cry*, contribuindo, desta maneira, para a variação da toxicidade de *B. thuringiensis* (MAHILLON et al., 1994; MISHRA, 2017). Por exemplo, os resultados de WANG; STEGGLES; ELLAR (2008) sugerem que o transposon Tn4430 pode ter um importante papel na virulência de *B. thuringiensis* durante a infecção em *Manduca sexta*.

Um segundo papel possível dos EGMs é o de mediar a transferência de plasmídeos por um processo que envolve a formação de estruturas de cointegração entre plasmídeos autoconjugativos ou não conjugativos e o DNA cromossômico. Este é o caso do Tn4430, que medeia a transferência de plasmídeos não conjugativos por um processo de condução (GREEN; BATTISTI; THORNE, 1989; SAILE; KOEHLER, 2006).

1.2.1 Plasmídeos de *Bacillus thuringiensis*

A maioria das linhagens de *B. thuringiensis* contém de 2 a 12 plasmídeos, com tamanhos variando entre 2 kb a 600 kb representando cerca de 10 – 20% do conteúdo genômico total desta bactéria (HAN, et al., 2006; ZHONG et al., 2011). No entanto, a partir de dados do NCBI, encontramos a linhagem *B. thuringiensis* BM-

BT15426 que não possui nenhum plasmídeo identificado, bem como a linhagem *B. thuringiensis* subespécie *thuringiensis* str. IS5056 que apresenta 14 plasmídeos.

Como já citado anteriormente, há grande variação entre os cromossomos das linhagens de *B. thuringiensis*, fato este que se repete em análises de perfil plasmidial, onde há grande variedade no conteúdo destes. Ademais, um padrão plasmidial parece estar relacionado a cada linhagem, subespécie ou qualquer outro grupo subespecífico da espécie (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004; REYES-RAMÍREZ; IBARRA, 2008).

O estudo de REYES-RAMÍREZ; IBARRA (2008) comparou os padrões plasmidiais de 84 linhagens consideradas tipo de *B. thuringiensis*, e identificou que 83 apresentaram padrões plasmidiais únicos de maneira que nenhuma apresentava sequer um único plasmídeo comigrante nos geis de agarose. Outras 47 linhagens de seis subespécies também foram comparadas e, alguns como o *israelensis*, apresentaram o mesmo padrão básico entre todas as suas linhagens, enquanto outros como *morrisoni*, mostraram uma grande diversidade de padrões. Estes resultados indicaram que os padrões de plasmídeos são ferramentas valiosas para discriminar estirpes abaixo do nível de subespécie.

FAGUNDES e colaboradores (2011) caracterizaram 59 linhagens de *B. thuringiensis* baseados no perfil plasmidial em gel de agarose, onde em 46 linhagens houve diferenciação nos padrões. RANGESHWARAN e colaboradores (2014) também identificaram padrões únicos no perfil plasmidial de cada uma das 29 linhagens de *B. thuringiensis* analisadas. Os plasmídeos ainda foram sondados para os genes *cry1*, *cry2* e *cry3* e os isolados apresentaram expressão diferencial dos genes.

A relevância dos plasmídeos nas linhagens de *B. thuringiensis* é assumida não só pela possibilidade de discriminação das linhagens, mas principalmente por serem fundamentais para a patogenicidade da espécie abrigando os genes *cry* (codificantes das proteínas inseticidas cristalinas) (BERRY et al., 2002; LOEZA-LARA et al., 2005; ROH et al., 2007). Normalmente estes genes estão localizados em grandes plasmídeos que, juntamente aos fagos e elementos conjugativos integrativos, são considerados os principais vetores da transferência horizontal de genes (HU et al., 2004; VAN DER AUWERA et al., 2007; SANTOS et al., 2010; SMILLIE et al., 2010). Tal aptidão é conferida através da mobilidade plasmidial atribuída a dois *operons*, o de mobilização (*mob*) e o de transferência (*tra*) e, a um

complexo de formação de pares conjugados associado à membrana (MPF), responsáveis pelo processamento do DNA conjugativo e pela formação do canal de acoplamento do plasmídeo à célula (SMILLIE et al., 2010; HOPP; GARDNER; SALYERS, 2015).

Os plasmídeos podem ser classificados em três categorias de acordo com a mobilidade: sendo conjugativos, quando codificam seu próprio conjunto de genes MPF; mobilizáveis, quando utilizam MPF de outro elemento genético presente na célula; e não-mobilizáveis, quando não são conjugativos nem mobilizáveis, espalhando-se por transformação natural ou transdução, ou ainda através da formação de co-integrados com EGMs (SMILLIE et al., 2010).

Análises no NCBI permitiram identificar que as três linhagens analisadas neste trabalho possuem ampla variação na quantidade e tamanho de seus plasmídeos. Pelo menos um dos plasmídeos de cada linhagem possui elementos que permitem a transferência de plasmídeos, alguns ainda com genes *cry*, que se apresentam de forma isolada ou em combinações. Nenhum plasmídeo apresenta genes relacionados a mobilização (FIGURA 2).

chamadas autoindutores (Ais), permitindo que as bactérias coordenem a expressão gênica e, conseqüentemente, comportem-se como um grupo coeso (RUTHERFORD; BASSLER, 2012). O QS controla genes que direcionam atividades como bioluminescência, esporulação, competência, produção de antibióticos, formação de biofilmes e secreção de fatores de virulência, permitindo que a comunidade bacteriana enfrente as mais variadas mudanças ambientais (VON BODMAN; WILLEY; DIGGLE, 2008; WILLIAMS; CÁMARA, 2009; RUTHERFORD; BASSLER, 2012; BASSLER; VOGEL, 2013).

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizam diferentes tipos de sistemas QS, classificados de acordo com as moléculas químicas usadas para a comunicação (RUTHERFORD; BASSLER, 2012). Em todos os sistemas, após a síntese, os autoindutores são exportados e sua concentração aumenta no meio extracelular de acordo com a densidade celular. Quando a concentração do autoindutor atinge um determinado limite, o sinal é detectado por um sensor específico localizado no citoplasma ou na membrana das bactérias relacionadas. Este evento desencadeia a expressão de um conjunto de genes que determina um comportamento de grupo (SLAMTI et al., 2014; HAWVER; JUNG; NG, 2016).

O estudo de QS em bactérias Gram-positivas levou à caracterização de uma nova família de reguladores QS denominada RNPP, de acordo com suas proteínas reguladoras: **Rap Fosfatases** do grupo *B. subtilis* e *B. cereus*, **NprR** do grupo *B. cereus*, **PlcR** do grupo *B. cereus* e **PrgX** de *Enterococcus faecalis* (DECLERCK et al., 2007; SLAMTI et al., 2016).

As proteínas RNPP regulam importantes funções biológicas no grupo *Bacillus cereus* atuando através de um peptídeo de sinalização secretado e de um regulador citoplasmático (TABELA 2), sendo o sensor PlcR o principal regulador de virulência do grupo (SLAMTI; LERECLUS 2002, SLAMTI et al., 2016).

Em *B. thuringiensis*, o ciclo infeccioso é dividido em diferentes estágios: virulência, sobrevivência e esporulação (SLAMTI et al., 2014). Inicialmente, o PlcR-PapR ativa genes envolvidos na virulência, causando a morte dos insetos (SLAMTI; LERECLUS, 2002). Então, o NprR-NprX ativa os genes necessários ao estilo de vida necrotrófico, permitindo que as bactérias sobrevivam no cadáver do inseto (DUBOIS et al., 2012). Além disso, este sistema QS também é necessário para conectar o necrotrofismo ao início da esporulação, regulada por Rap-Phr (FAZION et al., 2017; VERPLAETSE et al., 2017).

Tabela 2. Proteínas RNPP na regulação biológica do grupo *B. cereus lato sensu*.

Organismo	Proteína Reguladora	Moléculas sinalizadoras	Regulação biológica por QS	Referências
<i>B. thuringiensis</i>	PlcR	PapR	Virulência	AGAISSE, et al., 1999; GOHAR et al., 2002; 2008
<i>B. thuringiensis</i>	NprR	NprX	Necrotrofismo	CHITLARU et al., 2006; PERCHAT et al., 2011
<i>B. anthracis</i>	Rap	Phr	Esporulação, Conjugação, Formação de biofilme, Produção de proteases	KOETJE et al., 2003; BONGIORNI et al., 2006; SINGH et al., 2013; BOGUSLAWSKI; HILL; GRIFFITH, 2015
<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>	PlcR	PapR	Patogenicidade, Formação de biofilme	HSUEH et al., 2006 ; ROCHA-ESTRADA et al., 2010; FAZION et al., 2017

1.3.1 Sistema PapR/PlcR

Diversos genes codificantes para fatores de virulência foram identificados em linhagens de *B. thuringiensis* incluindo enzimas de degradação, hemolisinas, enterotoxinas hemolíticas e não hemolíticas, citotoxinas e proteases. Vários estudos têm mostrado que essas moléculas têm uma escala variável de contribuição para a virulência e estão envolvidas no fornecimento de alimentos, proteção celular e detecção ambiental (LUND; DE BUYSER; GRANUM, 2000; CALLEGAN et al., 2002; POMERANTSEV et al., 2009).

Estes genes são regulados positivamente pela expressão de um gene regulador pleiotrópico denominado *plcR* (SLAMTI et al., 2014). Este é o principal ativador de genes de virulência, sendo que, cerca de 80% das proteínas extracelulares produzidas durante a fase estacionária dependem de sua ação (SLAMTI; LERECLUS 2002; GOHAR et al., 2008; SLAMTI et al., 2016).

A atividade da proteína PlcR depende de PapR, um peptídeo de sinalização codificado pelo gene *papR*, localizado a jusante do gene *plcR*, e que atua como efetor de QS regulando a expressão gênica. Quando altas densidades celulares são alcançadas, há um aumento na concentração de PapR no interior das células, promovendo sua interação com a proteína PlcR. O complexo PapR/PlcR se liga ao seu sítio de reconhecimento no DNA desencadeando um ciclo de *feedback* positivo que regula a expressão destes genes e de fatores de virulência (SLAMTI; LERECLUS 2002; GOHAR et al., 2008; VILAS-BÔAS et al., 2012; SLAMTI et al.,

2014). No entanto, a base molecular para o controle da transcrição pelo complexo PapR/PlcR ainda é desconhecida (DECLERCK et al., 2007; SLAMTI et al., 2014).

1.4 RNAs NÃO CODIFICADORES

Durante muitos anos, os RNAs foram considerados apenas moléculas acessórias envolvidas na mediação de transcrição e tradução; no entanto, com a descoberta dos RNAs ribossômicos (RNAr) e RNAs de transferência (RNAt) na década de 1950, houve um aumento na identificação de RNAs não codificadores (ncRNAs) em procariotos e eucariotos (COSTA, 2005; LEE; MOON, 2018).

Um ncRNA é definido como qualquer molécula de RNA que não é traduzida em proteína, mas que está envolvido em diversos processos celulares (EDDY, 2001; COSTA, 2005; XUE; LI, 2008; SHANMUGAM; NAGARAJAN; PRAMANAYAGAM, 2017), sendo expressos em organismos nos três domínios de vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (FLICEK et al., 2011; KERSEY et al., 2014).

Atualmente, sabe-se que a porção do genoma de mamíferos transcrita em RNA e traduzida em proteínas funcionais corresponde a apenas 1 ou 2%, enquanto 98% de todo o genoma transcricional humano é representado por RNAs não codificantes (BROSNAN; VOINNET, 2009). Evidências ainda apontam que o aumento na complexidade dos organismos vivos parece estar diretamente associado à quantidade e variedade de ncRNAs (TAFT et al., 2007).

Com o avanço das pesquisas foram identificados e atribuídos papéis biológicos a um número cada vez maior de ncRNAs (TABELA 3) (COSTA, 2010; GIBB et al., 2011). O banco de dados Rfam, considerado um dos maiores relacionados à ncRNAs possuía 50 famílias quando criado em 2002 (GRIFFITHS-JONES et al., 2003). Atualmente, este apresenta um total de 2687 famílias diferentes de ncRNAs (KALVARI et al., 2017).

Ainda que não exista uma classificação universal, alguns consensos estão sendo estabelecidos, tendo sido criadas classes que incluem ncRNAs com as mais diversas estruturas secundárias, tamanhos e papéis biológicos (DINGER et al., 2008; GIBB et al., 2011).

Em humanos, estes são importantes em diversos eventos biológicos, incluindo a compensação de dose e inativação do cromossomo X, resposta à condições de estresse, regulação de atividades de proteínas no controle transcricional e regulação do desenvolvimento (SUZUKI; HAYASHIZAKI, 2004).

Em bactérias, desempenham papel importante na regulação de genes, principalmente a nível pós-transcricional, pois ajustam a fisiologia bacteriana em resposta a sinais ambientais, regulam a resistência à antibióticos, alteram a eficiência da tradução e/ou a estabilidade de RNAm, além de modular a atividade de proteínas (ULVÉ et al., 2007; WATERS; STORZ, 2009; LI et al., 2012; DAR; SOREK, 2017).

Tabela 3. Algumas famílias de ncRNAs identificadas em organismos procariotos e eucariotos, e suas respectivas funções.

	Definição	Função	Tamanho (nt)
gRNA	RNA guia	Orienta proteínas para ligação, modificação, ou clivagem sítio-específica	40-80
eRNA	RNA potencializador transcricional	Facilitador transcricional	200-500 (alguns maiores)
Íntron Grupo I	Classe estrutural de RNAs de auto- <i>splicing</i>	Auxilia no <i>splicing</i> de RNA	250-400
Íntron Grupo II	Classe estrutural de RNAs de auto- <i>splicing</i>	Auxilia no <i>splicing</i> através da formação de um íntron de lariat	600
HnRNA	RNA nuclear heterogêneo	Pré-RNAm contendo íntrons	2-40.000
IRES	Sítio interno de entrada do ribossomo	Permitir a iniciação interna da tradução em RNAm	200-300
lncRNA	Longo RNA não codificador	RNA transcrito de forma autônoma; frequentemente possui o <i>cap</i> e é poliadenilado	>200
miRNA	microRNA	Regulador traducional	~22
piRNA	RNA associado a PIWI	Repressor transcricional	27
pre-miRNA	miRNA precursor	Estrutura intermediária para obtenção de miRNAs	60
pre-mRNA	RNAm precursor	Transcrição primária de um gene que ainda contém íntrons	2-40.000
pre-rRNA	rRNA precursor	Intermediário do processo de transcrição que contém rRNAs maduros	13.700 Humanos 6.600 Leveduras 5.000 <i>E. coli</i>
pre-tRNA	tRNA transportador	Intermediário do processo de transcrição que contém tRNAs maduros	>100
pri-miRNA	miRNA primário transcrito	Estrutura intermediária para obtenção de miRNAs	>80

RepA RNA	Sequência de repetição RepA	Requerido para a inativação do cromossomo X	1.600
Riboswitch	Elemento regulatório de RNAm	Inibe ou promove a expressão gênica a nível transcricional, traducional ou <i>splicing</i> de RNA	40-140
RNase P RNA	Componente da ribonuclease P	Subunidade catalítica da enzima que remove 50- <i>leaders</i> de pré-tRNAs	400
rRNA	RNA ribossomal	Constituição do ribossomo	120, 160, 1.868, 5.025 Humanos 120, 1.541, 2.904 <i>E. coli</i>
tRNA	RNA transportador ou RNA de transferência	Transporte de aminoácidos até o ribossomo	75-95 Humanos
RNAi	RNA de interferência	Inibição a nível transcricional e traducional	21-26
siRNA	Pequeno RNA de interferência	Estrutura intermediária para obtenção de RNAi's	22
snoRNA	Pequeno RNA nucleolar	RNA guia no processamento de pre-rRNAs	70
snRNA	Pequeno RNA nuclear	Envolvido no <i>splicing</i> de RNA, regulação de fatores de transcrição, e manutenção do telômero	100-300
sRNA	Pequeno RNA regulador	Regulação da expressão gênica bacteriana	<300
T box	Elemento líder de ligação ao tRNA	Regulador transcricional	200
TR, TER ou TERC	RNA telomerase	Auxilia na síntese de DNA telomérico e montagem de proteínas	450 Humanos 1.200 Leveduras
ra siRNA	Pequeno RNA de interferência associado repetido	Regulação transcricional e estabelecimento e manutenção de estrutura de heterocromatina	24-29
NAT	Transcrito antisense	Envolvido no <i>splicing</i> alternativo, <i>imprinting</i> genômico e inativação do cromossomo X	>200
SRP RNA	Partícula de reconhecimento de sinal	Contribui para ligação e liberação do sinal do peptídeo	300
U snRNA	Pequeno RNA nuclear rico em uracila	Auxilia no <i>splicing</i> de RNA	100-300
6S RNA	RNA 6S	Regulador transcricional	184 <i>E. coli</i>
7SL RNA	Componente da partícula de reconhecimento de sinal (SRP)	Auxilia na secreção de proteínas	300

Adaptado de: EDDY, 2001; ZHANG et al., 2006; KLATTENHOFF et al., 2007; SAI LAKSHMI; AGRAWAL, 2007; ROSENBLAD et al., 2009; COSTA, 2010; GIBB; BROWN; LAM, 2011; CECH; STEITZ, 2014.

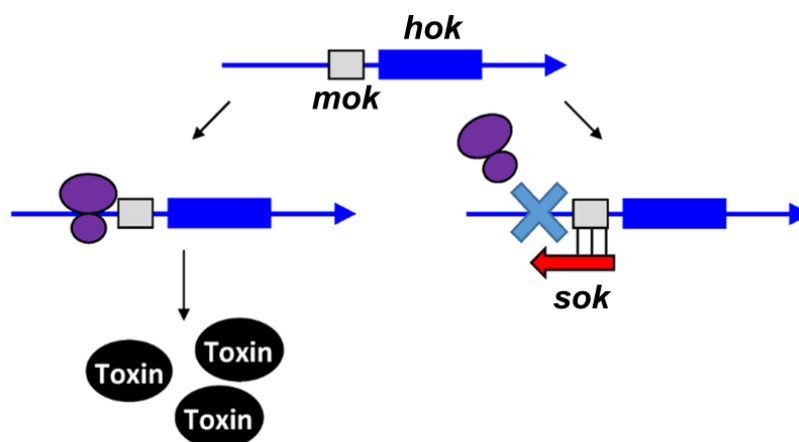
1.4.1 Sistema hok/sok

Bactérias possuem genes cuja expressão pode inibir o crescimento celular e até mesmo resultar em morte celular quando super expressos refletindo semelhanças com a apoptose celular eucariótica. Dentre estes, os sistemas de toxina-antitoxina (TA) contribuem em grande parte para a maquinaria reguladora epigenética bacteriana (ENGELBERG-KULKA; HAZAN; AMITAI, 2006; YAMAGUCHI; PARK; INOUE, 2011).

Um sistema do tipo TA já elucidado é o hok/sok, mecanismo de morte pós-segregacional (PKS) atribuído ao plasmídeo R1 de *Escherichia coli* (GERDES; THISTED; MARTINUSSEN, 1990; HAYES, 2003; GERDES; WAGNER, 2007). Esse sistema permite apenas a sobrevivência das células com este plasmídeo, algo que, do ponto de vista evolutivo, se mostra mais vantajoso ou adaptativo (COTRIM et al., 2010).

O sistema envolve três genes: *hok* (*host killing*) responsável pela produção da proteína tóxica Hok, capaz de danificar irreversivelmente a membrana celular. *sok* (*suppression of killing*) um RNA antisense capaz de bloquear a tradução de *hok* e, por fim, o gene *mok* (*modulation of killing*), necessário para a tradução de *hok* (GERDES; THISTED; MARTINUSSEN, 1990; FARIDANI et al., 2006; GERDES; WAGNER, 2007).

Figura 3. Representação do funcionamento do sistema hok/sok.



A tradução do RNAm de *hok* (azul) depende da tradução de *mok* (branco) pelo ribossomo. A ligação do ncRNA *Sok* (vermelho) bloqueia o processo de tradução, impedindo a expressão da proteína *Hok*.
Adaptado de: WEN; FOZO, 2014.

As células filhas, incluindo descendentes livres de plasmídeos, herdarão as moléculas de RNA dos genes *hok* e *sok* das células mãe. Porém, as moléculas de RNA de *sok* se desintegram rapidamente, de tal forma que as células que não possuírem o plasmídeo não conseguirão sintetizá-la novamente. Sem o repressor, a proteína Hok será traduzida sendo letal aos descendentes livres de plasmídeos (GERDES; THISTED; MARTINUSSEN, 1990; FARIDANI et al., 2006; GERDES; WAGNER, 2007).

A regulação desse sistema foi estudada em detalhes, sendo que diversas descobertas ocorreram. Dentre elas, a de que Sok é um RNA não codificador (THISTED; GERDES, 1992; GERDES; WAGNER, 2007).

1.4.2 Modo de ação dos ncRNAs

Devido às propriedades físico-químicas, as moléculas de ncRNAs são muito versáteis, sendo capazes de formar estruturas terciárias complexas que possibilitam desempenhar diversas funções (COSTA, 2005). A maioria dos ncRNAs com função já descrita realizam a regulação ligando-se à RNAm ou a proteínas (VOGEL; WAGNER, 2007). Estes formam complexos que permitem controlar diversos aspectos da expressão gênica e aumentar o número de conexões moleculares nas células (MATTICK, 2004).

Normalmente, a regulação ocorre pelo reconhecimento por pareamento de bases permitindo que um único ncRNA se vincule a múltiplos alvos e, desse modo, regule diversas vias metabólicas ao mesmo tempo, em uma ampla gama de condições (PETERSON et al., 2014; DUVAL; COSSART; LEBRETON, 2017).

Como reguladores de RNAm, os ncRNAs podem modular a tradução de um gene dependendo de onde realizam a interação, e da alteração que ocorrerá na estrutura secundária do RNAm alvo (LEASE; BELFORT, 2000; EGGENHOFER et al., 2011; JANG et al., 2018). Pode haver repressão traducional quando o RNAm é degradado; ou então, quando a interação expõe a sequência Shine-Dalgarno, o acesso do ribossomo ao RNAm é facilitado aumentando a eficiência do processo de tradução (LEASE; BELFORT, 2000; MAJDALANI et al., 2001; SHANMUGAM; NAGARAJAN; PRAMANAYAGAM, 2017). Frequentemente, essas interações são estabilizadas pela proteína Hfq, uma chaperona conservada em muitas espécies bacterianas (LIU; CAMILLI, 2010).

Outra forma de regulação induzida pelos ncRNAs envolve a alteração da atividade de proteínas. Nesse caso, as proteínas tornam-se alvos diretos dos ncRNAs que modulam a sua atividade (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011).

Baseados em sua localização e forma de ação, os ncRNAs podem ser organizados em cis-RNAs, trans-RNAs e *Riboswitches* (HOUSELEY et al., 2008; PICHON; FELDEN, 2008; WATERS; STORZ, 2009; D'ALIA et al., 2010).

1.4.2.1 Cis-RNAs

Os ncRNAs classificados como cis são transcritos antisenso ao seu RNAm alvo, regulando-o através de pareamento perfeito de bases, o que ocorre de forma rápida e com alta afinidade (GEORG; HESS, 2011; STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011; PRASSE et al., 2013). Essa interação altera a estrutura secundária das duas moléculas influenciando a estabilidade e a meia vida desses RNAs (LASA; TOLEDO-ARANA; GINGERAS, 2012).

Seu principal papel é regular processos como replicação e tradução, eficiência de conjugação, degradação de RNAm e expressão de genes (BRANTL, 2007; SMIRNOV et al., 2017). Os exemplos mais bem estudados residem em plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis sendo responsáveis por manter o número de cópias apropriado do elemento (BRANTL, 2007; WATERS; STORZ, 2009).

1.4.2.2 Trans-RNAs

Os trans-RNAs são transcritos em regiões genômicas distantes de seu RNAm alvo e geralmente compartilham pouca complementaridade de bases com o mesmo (PICHON; FELDEN, 2008).

Comumente, a interação entre estes ncRNAs e seus alvos ocorre por pareamentos de bases pequenos e imperfeitos, possibilitando a existência de múltiplos alvos. Para a estabilização desta interação, a chaperona Hfq altera a estrutura secundária do ncRNA expondo seu sítio de pareamento de bases (AIBA, 2007; PAPENFORT; VOGEL, 2009). Outro papel importante realizado pela proteína Hfq é a proteção do RNAm alvo ou do ncRNA contra a digestão por RNase E decorrente da competição entre a proteína e a RNase pelo mesmo sítio de ligação (MOLL et al., 2003; ZHANG et al., 2003; STORZ; OPDYKE; ZHANG, 2004).

Os trans-RNAs podem alterar a estabilidade do RNAm, ou ainda, ligar-se à região do sítio de ligação do ribossomo (RBS) do RNAm alvo bloqueando o processo de tradução (WATERS; STORZ, 2009; SMIRNOV et al., 2017). Podem também regular a atividade de proteínas sequestrando-as através dos sítios de ligação de RNA presente nessas moléculas; inibindo, modificando ou ativando sua atividade (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011).

1.4.2.3 *Riboswitches*

Riboswitches são moléculas de RNA localizadas na região 5' UTR de um RNAm capazes de controlar a expressão gênica a nível transcricional e traducional (BREAKER, 2012). Em relação à regulação transcricional, o *Riboswitch* é capaz de controlar moléculas, permitindo que um grampo terminador intrínseco seja exposto ou ocultado levando à expressão ou inativação de um gene (WACHSMUTH et al., 2012). No que concerne à regulação traducional, uma estrutura denominada antiRBS é complementar ao sítio de ligação ribossomal do RNAm e, quando formada, impede que o ribossomo inicie o processo de tradução (TOPP; GALLIVAN, 2010).

Os *Riboswitches* são capazes de se ligar a metabólitos ou íons metálicos, podendo responder à mudanças ambientais, como por exemplo, a alteração de temperatura (SMITH et al., 2010). A ligação e o reconhecimento do ligante ou o estímulo ambiental acontecem em uma região conhecida como sensor, provocando alterações na estrutura secundária do RNA, desencadeando o processo de regulação (JOHANSSON, 2009).

Devido sua localização, os *Riboswitches* são sintetizados anteriormente ao RNAm, possibilitando que a resposta à ligação do metabólito aconteça antes de sua transcrição total. Dessa forma, o processo de regulação é biologicamente viável, pois evita gastos energéticos na produção de RNAm inteiros (BREAKER, 2011).

1.4.3 RNAs não codificadores em *Bacillus thuringiensis*

Até o presente momento, nenhum trabalho avaliando o genoma de *B. thuringiensis* em busca especificamente de ncRNAs foi publicado. Porém, alguns estudos já identificaram a presença de RNAs não codificadores em *Bt*. Este é o caso de RANG e colaboradores (2015) que identificaram um total de 94 ncRNAs distribuídos em 4 famílias (tRNA e rRNAs 5S, 16S e 23S) na estirpe 4.0718; e QUAN

e colaboradores (2016), que identificaram 148 ncRNAs na estirpe X022 ao realizar uma análise comparativa com a estirpe 4.0718.

1.5 BIOINFORMÁTICA E ncRNAs

O termo bioinformática refere-se à métodos computacionais para o armazenamento, processamento, análise, previsão e modelagem de dados biológicos com ajuda das ciências e tecnologias da computação (ALVES, 2013). Desde seu surgimento, vem sendo utilizada para análises *in silico* de questões biológicas, a partir de técnicas matemáticas e estatísticas, tornando-se uma parte importante em áreas da biologia molecular (ESPINDOLA et al., 2010). As ferramentas de bioinformática auxiliam na comparação de dados genéticos e genômicos, assim como na compreensão dos aspectos evolutivos do material genético (HOGEWEG, 2011).

A multidisciplinaridade da área da bioinformática possibilitou à comunidade científica inúmeras aplicações em genômica. Esses trabalhos, somados às tecnologias de alto desempenho na geração e análise de dados, têm permitido o uso de abordagens abrangentes no estudo da estrutura, organização de genomas, expressão diferencial, predição e classificação funcional de genes, além de demonstrar sua relação com proteínas (HAGEN, 2000; ALVES, 2013).

De um modo geral, existem três categorias principais de métodos computacionais para predição de ncRNAs: (1) métodos baseados em homologia de sequência e estruturas de RNA conservadas de forma evolutiva; (2) métodos *de novo* utilizando a sequência de RNA e características estruturais e (3) métodos de sequenciamento transcricional e montagem (ZHANG et al., 2017).

Abordagens computacionais podem ser utilizadas para a predição de ncRNAs localizando sequências de DNA conservadas e que estão presentes em regiões intergênicas de espécies relacionadas filogeneticamente (RIVAS; EDDY, 2001). A ideia central é analisar a potencial conservação de estruturas secundárias entre trechos com algum grau de similaridade entre os genomas. Essa técnica é passível de ser aplicada para identificação de ncRNAs por varredura em genomas, principalmente no caso de organismos com pouca ou nenhuma informação de ncRNAs (HERTEL et al., 2009; SONG et al., 2009).

Os métodos *de novo* baseados em sequência, exploram a descoberta de que as frequências de muitos *k*-mers para ncRNAs em uma família específica

geralmente compartilham distribuição de probabilidade similar, permitindo prever ncRNAs a partir desta frequência. Podem também prever a partir de características estruturais, levando em consideração atributos físico-químicos como a estabilidade termodinâmica da molécula (TRAN et al., 2009; ZHANG et al., 2017).

Atualmente, novos métodos computacionais possibilitam a análise de genomas bacterianos de espécies divergentes utilizando ferramentas que permitem, por exemplo, analisar dados de experimentos de RNA-Seq (TRAPNELL et al., 2012). Uma das abordagens mais modernas é a genômica comparativa que consiste na análise e comparação do material genético de diferentes espécies, com o propósito de estudar a estrutura, organização e evolução dos genomas, juntamente a funções dos genes e regiões não codificantes (CATANBO; DEGRAVE; DE MIRANDA, 2007).

Estas diferentes sistemáticas têm identificado um grande número de novos ncRNAs, comprovando a importância da análise computacional para responder questões relacionadas ao número e diversidade de genes de RNAs não codificantes (MATTICK, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e comparar, por meio de ferramentas de bioinformática, RNAs não codificadores de sequências genômicas de três linhagens de *B. thuringiensis* obtidas a partir de bancos de dados públicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, classificar e mapear os segmentos genômicos de ncRNAs nos genomas selecionados de *B. thuringiensis*;
- Identificar possíveis alvos de ncRNAs e correlacioná-los com funções importantes nos genomas;
- Validar a expressão de um ncRNA e descrever a sua função biológica nas linhagens empregadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism. **Insect Midgut Insect. Proteins**, v. 47, p. 39, 2014.
- AGAISSE, H.; GOMINET, M.; ØKSTAD, O. A.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1043-1053, 1999.
- AIBA, H. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 2, p. 134-139, 2007.
- ALVARENGA, D. O.; MOREIRA, L. M.; CHANDLER, M.; VARANI, A. M. A practical guide for comparative genomics of mobile genetic elements in prokaryotic genomes. In: Comparative Genomics. **Humana Press**, New York, NY, p. 213-242, 2018.
- ALVES, S. M. A bioinformática e sua importância para a biologia molecular. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 3, n. 4, p. 18-25, 2013.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, 2010.
- APAYDIN, Ö.; YENIDÜNYA, A. F.; HARSA, Ş.; GÜNEŞ, H. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 285-292, 2005.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L.A; BARROS, N. M; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária, p. 269-293, 2002.
- ARONSON, A. I. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. **Molecular microbiology**, v. 7, n. 4, p. 489-496, 1993.
- BASSLER, B.; VOGEL, J. Bacterial regulatory mechanisms: the gene and beyond. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 2, p. 109, 2013.
- BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Journal of Applied Entomology**, v. 2, n. 1, p. 29-56, 1915.
- BERNHARD, K; JARRETT, P., MEADOWS, M., BUTT, J., ELLIS, D. J., ROBERTS, G. M., PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, n. 1, p. 59-68, 1997.

- BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; GOLDE, M. T. H.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, 2002.
- BOGUSLAWSKI, K. M.; HILL, P. A.; GRIFFITH, K. L. Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors *Spo0A* and *ComA* by the plasmid-encoded quorum sensing regulators Rap60-Phr60 in *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 96, n. 2, p. 325-348, 2015.
- BÖHM, M. E.; HUPTAS, C.; KREY, V. M.; SCHERER, S. Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. **BMC evolutionary biology**, v. 15, n. 1, p. 246, 2015.
- BONGIORNI, C.; STOESSEL, R.; SHOEMAKER, D.; PEREGO, M. Rap phosphatase of virulence plasmid pXO1 inhibits *Bacillus anthracis* sporulation. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 487-498, 2006.
- BRANTL, S. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.2, p. 102-109, 2007.
- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.
- BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n.4, p. 423-435, 2007.
- BREAKER, R. R. Prospects for riboswitch discovery and analysis. **Molecular cell**, v. 43, n. 6, p. 867-879, 2011.
- BREAKER, R. R. Riboswitches and the RNA world. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 2, p. a003566, 2012.
- BROSNAN, C. A.; VOINNET, O. The long and the short of noncoding RNAs. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 3, p. 416-425, 2009.
- CALLEGAN, M. C.; ENGELBERT, M.; PARKE, D. W.; JETT, B. D.; GILMORE, M. S. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 111-124, 2002.
- CARDAZZO, B.; NEGRISOLO, E.; CARRARO, L.; ALBERGHINI, L.; PATARNELLO, T.; GIACCONE, V. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 3, p. 850-860, 2008.

CATANBO, M.; DEGRAVE, W. M.; DE MIRANDA, A. B. D. Análise Comparativa de Genomas Procarióticos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ed. 37, 2007.

CECH, T. R.; STEITZ, J. A. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 77-94, 2014.

CHAUFAUX, J.; MARCHAL, M.; GILOIS, N.; JEHANNO, I.; BUISSON, C. Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travers le monde. **Canadian journal of microbiology**, v. 43, n. 4, p. 337-343, 1997.

CHITLARU, T.; GAT, O.; GOZLAN, Y.; ARIEL, N.; SHAFFERMAN, A. Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct plasmid and chromosome CO₂-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3551-3571, 2006.

COSTA, F. F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. **Gene**, v. 357, n. 2, p. 83-94, 2005.

COSTA, F. F. Non-coding RNAs: meet thy masters. **Bioessays**, v. 32, n. 7, p. 599-608, 2010.

COTRIM, C. A., GARRIDO, S. S., TROVATTI, E., MARCHETTO, R. Synthesis, characterization and interaction studies of an analog of CcdA antitoxin by steady state fluorescence. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 841-845, 2010.

D'ALIA, D.; NIESELT, K.; STEIGELE, S.; MÜLLER, J.; VERBURG, I.; TAKANO, E. Noncoding RNA of glutamine synthetase I modulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 4, p. 1160-1164, 2010.

DAMGAARD, P. H.; ABDEL-HAMEED, A.; EILENBERG, J.; SMITS, P. H. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass foliage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 239-242, 1998.

DAR, D.; SOREK, R. Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 36, p. 111-117, 2017.

DECLERCK, N.; BOUILLAUT, L.; CHAIX, D.; RUGANI, N.; SLAMTI, L.; HOH, F.; LERECLUS, D.; AROLD, S. T. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 47, p. 18490-18495, 2007.

DE SOUZA LIMA, G. M. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 119-137, 2013.

DINGER, M. E.; PANG, K. C.; MERCER, T. R.; MATTICK, J. S. Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. **PLoS computational biology**, v. 4, n. 11, p. e1000176, 2008.

DREWNOWSKA, J. M.; ŚWIECICKA, I. Eco-genetic structure of *Bacillus cereus* sensu lato populations from different environments in Northeastern Poland. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e80175, 2013.

DUBOIS, T.; FAEGRI, K.; PERCHAT, S.; LEMY, C.; BUISSON, C.; NIELSEN-LEROUX, C.; GOHAR, M.; JACQUES, P.; RAMARAO, N.; KOLSTØ, A-B.; LERECLUS, D. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002629, 2012.

DUVAL, M.; COSSART, P.; LEBRETON, A. Mammalian microRNAs and long noncoding RNAs in the host-bacterial pathogen crosstalk. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, p. 11-19, 2017.

EDDY, S. R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 12, p. 919-929, 2001.

EGGENHOFER, F.; TAFER, H.; STADLER, P. F.; HOFACKER, I. L. RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_2, p. W149-W154, 2011.

ENGELBERG-KULKA, H.; HAZAN, R.; AMITAI, S. MazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 4327-4332, 2005.

ESPINDOLA, F. S.; CALÁBRIA, L. K.; DE REZENDE, A. A. A.; PEREIRA, B. B.; SANTANA, F. A.; AMARAL, I. M. R.; DOS SANTOS, L. P. Bioinformatic resources applied on the omic sciences as genomic, transcriptomic, proteomic, interatomic and metabolomic. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.

FAGUNDES, R. B. S.; PICOLI, E. A. T.; LANA, U. G. P.; VALICENTE, F. H. Plasmid patterns of efficient and inefficient strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical entomology**, v. 40, n. 5, p. 600-606, 2011.

FANG, Y.; LI, Z.; LIU, J.; SHU, C.; WANG, X.; ZHANG, X.; YU, X.; ZHAO, D.; LIU, G.; HU, S.; ZHANG, J.; AL-MSSALLEM, I.; YU, J. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, n. 12, p. 567-576, 2011.

FARIDANI, O. R.; NIKRAVESH, A.; PANDEY, D. P.; GERDES, K.; GOOD, L. Competitive inhibition of natural antisense Sok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 20, p. 5915-5922, 2006.

FAZION, F.; PERCHAT, S.; BUISSON, C.; VILAS-BOAS, G.; LERECLUS, D. A plasmid-borne Rap-phr system regulates sporulation of *Bacillus thuringiensis* in insect larvae. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 1, p. 145-155, 2017.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 271-275, 1992.

FLICEK, P.; AMODE, M. R.; BARRELL, D.; BEAL, K.; BRENT, S.; CARVALHO-SILVA, D.; ... & GIL, L. Ensembl 2012. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D84-D90, 2011.

GEORG, J.; HESS, W. R. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 286-300, 2011.

GARCÍA, K.; IBARRA, J. E.; BRAVO, A.; DÍAZ, J.; GUTIÉRREZ, D.; TORRES, P. V.; DE LEON, P. G. Variability of *Bacillus thuringiensis* strains by ERIC-PCR and biofilm formation. **Current microbiology**, v. 70, n. 1, p. 10-18, 2015.

GERDES, K.; THISTED, T.; MARTINUSSEN, J. Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: sok antisense RNA regulates formation of a hok mRNA species correlated with killing of plasmid-free cells. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 1807-1818, 1990.

GERDES, K.; WAGNER, E. G. H. RNA antitoxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 117-124, 2007.

GIBB, E. A.; BROWN, C. J.; LAM, W. L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 38, 2011.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: **Wiley**, 2000.

GOHAR, M.; ØKSTAD, O. A.; GILOIS, N.; SANCHIS, V. LERECLUS, D. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. **Proteomics**, v. 2, n. 6, p. 784-791, 2002.

GOHAR, M.; FAEGRI, K.; PERCHAT, S.; RAVNUM, S.; ØKSTAD, O. A.; GOMINET, M.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2793, 2008.

GREEN, B. D.; BATTISTI, L.; THORNE, C. B. Involvement of Tn4430 in transfer of *Bacillus anthracis* plasmids mediated by *Bacillus thuringiensis* plasmid pXO12. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 1, p.104–113, 1989.

GRIFFITHS-JONES, S.; BATEMAN, A.; MARSHALL, M.; KHANNA A.; EDDY, S. R. Rfam: an RNA family database. **Nucleic Acids Research**. v. 31, p. 439-441, 2003.

HAGEN, J. B. The origins of bioinformatics. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 3, p. 231–6, 2000.

HALL, J. P.J.; BROCKHURST, M. A.; HARRISON, E. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 372, n. 1735, p. 20160424, 2017.

HAN, C. S. XIE, G.; CHALLACOMBE, J. F.; ALTHERR, M. R.; BHOTIKA, S. S.; BRUCE, D.; ... & CLELAND, C. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3382-3390, 2006.

HAWVER, L. A.; JUNG, S. A.; NG, W-L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 5, p. 738-752, 2016.

HAYES, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. **Science**, v. 301, n. 5639, p. 1496-1499, 2003.

HERTEL, J.; DE JONG, D.; MARZ, M.; ROSE, D.; TAFER, H.; TANZER, A.; SCHIERWATER, B.; STADLER, P. F. Non-coding RNA annotation of the genome of *Trichoplax adhaerens*. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 5, p. 1602-1615, 2009.

HOGEWEG, P. The roots of bioinformatics in theoretical biology. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 3, p. 1–5, 2011.

HOPP, C. M.; GARDNER, J. F.; SALYERS, A. A. The Xis2d protein of CTnDOT binds to the intergenic region between the *mob* and *tra* operons. **Plasmid**, v. 81, p. 63-71, 2015.

HOUSELEY, J.; RUBBI, L.; GRUNSTEIN, M.; TOLLERVEY, D.; VOGELAUER, M. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast *GAL* gene cluster. **Molecular cell**, v. 32, n. 5, p. 685-695, 2008.

HSUEH, Y. H.; SOMERS, E. B.; LERECLUS, D.; WONG, A. C. L. Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5089-5092, 2006.

HU, X.; HANSEN, B. M.; EILENBERG, J. R.; HENDRIKSEN, N. B.; SMIDT, L.; YUAN, Z.; JENSEN, G. B. Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. **FEMS microbiology letters**, v. 231, n. 1, p. 45-52, 2004.

JANG, S.; JANG, S.; YANG, J.; SEO, S. W.; JUNG, G. Y. RNA-based dynamic genetic controllers: development strategies and applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 53, p. 1-11, 2018.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; ... CODONER, F. M. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383-391, 2013.

JOHANSSON, J. RNA thermosensors in bacterial pathogens. In: Bacterial Sensing and Signaling. **Karger Publishers**, p. 150-160, 2009.

JUNG, M-Y.; PAEK, W. K.; PARK, I. S.; HAN, J. R.; SIN, Y.; PAEK, J.; RHEE, M-S.; KIM, H.; SONG, H. S.; CHANG, Y. H. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 867-871, 2010.

JUNG, M-Y.; KIM, J. S.; PAEK, W. K.; LIM, J.; LEE, H.; KIM, P. I.; MA, J. Y.; KIM, W.; CHANG, Y-H. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1027-1032, 2011.

KALVARI, I.; ARGASINSKA, J.; QUINONES-OLVERA, N.; NAWROCKI, E. P.; RIVAS, E.; EDDY, S. R.; ... PETROV, A. I. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D335-D342, 2017.

KERSEY, P. J.; ALLEN, J. E.; CHRISTENSEN, M.; DAVIS, P.; FALIN, L. J.; GRABMUELLER, C.; ... LANGRIDGE, N. Ensembl Genomes 2013: scaling up access to genome-wide data. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D546-D552, 2013.

KLATTENHOFF, C.; BRATU, D. P.; MCGINNIS-SCHULTZ, N.; KOPPETSCH, B. S.; COOK, H. A.; THEURKAUF, W. E. *Drosophila* rasiRNA pathway mutations disrupt embryonic axis specification through activation of an ATR/Chk2 DNA damage response. **Developmental cell**, v. 12, n. 1, p. 45-55, 2007.

KLEE, S. R.; BRZUSZKIEWICZ, E. B.; NATTERMANN, H.; BRÜGGEMANN, H.; DUPKE, S.; WOLLHERR, A.; FRANZ, T.; PAULI, G.; APPEL, B.; LIEBL, W.; COUACY-HYMAN, E.; BOESCH, C.; MEYER, F. D.; LEENDERTZ, F. H.; ELLERBROK, H.; GOTTSCHALK, G.; GRUNOW, R.; LIESEGANG, H. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e10986, 2010.

KOETJE, E. J.; HAJDO-MILASINOVIC, A.; KIEWIET, R.; BRON, S.; TJALSMA, H. A plasmid-borne Rap–Phr system of *Bacillus subtilis* can mediate cell-density controlled production of extracellular proteases. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 19-28, 2003.

LACOURSIÈRE, J.; BOISVERT, J. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. **Environnement Québec**, 2004.

LANG, A.; BEATTY, J. T.; RICE, P. A. Guest editorial: Mobile genetic elements and horizontal gene transfer in prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, 2017.

LASA, I.; TOLEDO-ARANA, A.; GINGERAS, T. R. An effort to make sense of antisense transcription in bacteria. **RNA biology**, v. 9, n. 8, p. 1039-1044, 2012.

LEASE, R. A.; BELFORT, M. A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 18, p. 9919-9924, 2000.

LEE, Y. J.; MOON, T. S. Design rules of synthetic non-coding RNAs in bacteria. **Methods**, 2018.

LERECLUS, D.; ARANTES, O.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS microbiology letters**, v. 60, n. 2, p. 211-217, 1989.

LÉONARD, C.; CHEN, Y.; MAHILLON, J. Diversity and differential distribution of IS231, IS232 and IS240 among *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides*. **Microbiology**, v. 143, n. 8, p. 2537-2547, 1997.

LI, W.; YING, X.; LU, Q.; CHEN, L. Predicting sRNAs and their targets in bacteria. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 10, n. 5, p. 276-284, 2012.

LIU, J. M.; CAMILLI, A. A broadening world of bacterial small RNAs. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 1, p. 18-23, 2010.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of next-generation sequencing systems. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

LIU, B.; LIU, G. H.; HU, G. P.; CETIN, S.; LIN, N. Q.; TANG, J. Y.; TANG, W. Q.; LIN, Y. Z. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 3, p. 501-510, 2014.

LOEZA-LARA, P. D.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; OCHOA-ZARZOSA, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; VALDEZ-ALARCON, J. J.; LÓPEZ-MEZA, J. E. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. darmstadiensis (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. **Plasmid**, v. 54, n. 3, p. 229-240, 2005.

LUND, T.; DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, 2000.

MAHILLON, J.; REZSÖHAZY, R.; HALLET, B.; DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: A review. **Genetica**, v. 93, n. 1-3, p. 13-26, 1994.

MAJDALANI, N.; CHEN, S.; MURROW, J.; ST John, K.; GOTTESMAN, S. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1382-1394, 2001.

MATTICK, J. S. RNA regulation: A new genetics? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 4, p. 316, 2004.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 1, p. 17-29, 2006.

MEADOWS, M. P.; ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRETT, P.; BURGESS, H. D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1344-1350, 1992.

MENOU, G.; MAHILLON, J.; LECADET, M. M.; LERECLUS, D. Structural and genetic organization of IS232, a new insertion sequence of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6689-6696, 1990.

MILLER, R. A.; BENO, S. M.; KENT, D. J.; CARROLL, L. M.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; KOVAC, J. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4744-4753, 2016.

MISHRA, R. Biosafety of *Bt*-crop in soil ecosystem: A review. **IJAR**, v. 3, n. 7, p. 107-119, 2017.

MOLL, I.; AFONYUSHKIN, T.; VYTVYTSKA, O.; KABERDIN, V. R.; BLÄSI, U. Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. **Rna**, v. 9, n. 11, p. 1308-1314, 2003.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Porto Alegre: Edgar Blücher, v. 3, p. 249-278, 2001.

MURAWSKA, E.; FIEDORUK, K.; ŚWIECICKA, I. Modular genetic architecture of the toxigenic plasmid pIS56–63 harboring cry1Ab21 in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain IS5056. **Pol. J. Microbiol**, v. 63, p. 147-156, 2014.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PAPENFORT, K.; VOGEL, J. Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. **Research in microbiology**, v. 160, n. 4, p. 278-287, 2009.

PATINO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in microbiology**, v. 168, n. 4, p. 309-318, 2017.

PERCHAT, S.; DUBOIS, T.; ZOUHIR, S.; GOMINET, M.; PONCET, S.; LEMY, C.; LERECLUS, D. A cell–cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Molecular microbiology**, v. 82, n. 3, p. 619-633, 2011.

PÉREZ-LOSADA, M.; CABEZAS, P.; CASTRO-NALLAR, E.; CRANDALL, K. A. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 38-53, 2013.

PETERSON, S. M.; THOMPSON, J. A.; UFKIN, M. L.; SATHYANARAYANA, P.; LIAW, L.; CONGDON, C. B. Common features of microRNA target prediction tools. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 23, 2014.

PICHON, C.; FELDEN, B. Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2807-2813, 2008.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2003.

POLANCZYK, R. A.; VAN FRANKENHUYZEN, K.; PAULI, G. The American *Bacillus thuringiensis* Based Biopesticides Market. In: *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. **Springer**, Cham, p. 173-184, 2017.

POMERANTSEV, A. P.; POMERANTSEVA, O. M.; CAMP, A. S.; MUKKAMALA, R.; GOLDMAN, S.; LEPPLA, S. H. PapR peptide maturation: role of the NprB protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR global gene regulation. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 361-377, 2009.

PRASSE, D.; EHLERS, C.; BACKOFEN, R.; SCHMITZ, R. A. Regulatory RNAs in archaea: first target identification in Methanoarchaea. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n.1, p. 344-349, 2013.

QUAN, M.; XIE, J.; LIU, X.; LI, Y.; RANG, J.; ZHANG, T.; ... DING, X. Comparative Analysis of Genomics and Proteomics in the New Isolated *Bacillus thuringiensis* X022 Revealed the Metabolic Regulation Mechanism of Carbon Flux Following Cu²⁺ Treatment. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 792, 2016.

RABINOVITCH, L.; VIVONI, A. M.; MACHADO, V.; KNAAK, N.; BERLITZ, D. L.; POLANCZYK, R. A.; FIUZA, L. M. *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In: *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. **Springer**, Cham, p. 1-18, 2017.

RAI, A. R.; MESHAM, S. U.; DONGRE, A. B. Optimization of RAPD-PCR for discrimination of different strains of *Bacillus thuringiensis*. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 2, p. 4307-4312, 2009.

RANG, J.; HE, H.; WANG, T.; DING, X.; ZUO, M.; QUAN, M.; ... XIA, L. Comparative analysis of genomics and proteomics in *Bacillus thuringiensis* 4.0718. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119065, 2015.

RANGESHWARAN, R.; GORKY, A.; VELAVAN, V.; ASHWITHA, K.; SIVAKUMAR, G.; MOHAN, M. Cry gene and plasmid profiling of *Bacillus thuringiensis* isolated from Indian soils. **Journal of Biological Control**, v. 28, n. 4, p. 185-191, 2014.

RAYMOND, B.; FEDERICI, B. A. In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity—a response to EFSA. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 7, 2017.

REYES-RAMÍREZ, A.; IBARRA, J. E. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 1, p. 125-129, 2008.

RIVAS, E.; EDDY, S. R. Noncoding RNA gene detection using comparative sequence analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 2, p. 8, 2001.

ROCHA-ESTRADA, J.; ACEVES-DIEZ, A. E.; GUARNEROS, G.; DE LA TORRE, M. The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 913-923, 2010.

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; LI, M. S.; JIN, B. R.; JE, Y. H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 547, 2007.

ROSENBLAD, M. A.; LARSEN, N.; SAMUELSSON, T.; ZWIEB, C. Kinship in the SRP RNA family. **RNA biology**, v. 6, n. 5, p. 508-516, 2009.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427, 2012.

SAADAOU, I.; AL-THANI, R.; AL-SAAD, F.; HASSAN, N. B. B.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; SCHULTZ, P.; ROUIS, S.; JAOUA, S. Characterization of tunisian *Bacillus thuringiensis* strains with abundance of kurstaki subspecies harbouring insecticidal activities against the lepidopteran insect *Ephestia kuehniella*. **Current microbiology**, v. 61, n. 6, p. 541-548, 2010.

SAHUKHAL, G. S.; SHRESTHA, U. T.; LEKHAK, B. Genetic Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* Isolates by Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 10, p. 97-103, 2009.

SAI LAKSHMI, S.; AGRAWAL, S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_1, p. D173-D177, 2007.

SAILE, E.; KOEHLER, T. M. *Bacillus anthracis* Multiplication, Persistence, and Genetic Exchange in the Rhizosphere of Grass Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3168-3174, 2006.

SALAMA, H. S.; EL-GHANY, NM Abd; SAKER, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 101-109, 2015.

SANTOS, C. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; LERECLUS, D.; SUZUKI, M. T.; ANGELO, E. A.; ARANTES, O. M. Conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus*

cereus strains is not directly correlated with growth of recipient strains. **Journal of invertebrate pathology**, v. 105, n. 2, p. 171-175, 2010.

SAUKA, D. H.; BASILE, J. I.; BENINTENDE, G. Evidence of *Bacillus thuringiensis* intra-serovar diversity revealed by *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 21, n. 3-4, p. 184-190, 2011.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, s.n., v. 62, p. 775-806, 1998.

SHANMUGAM, A.; NAGARAJAN, A.; PRAMANAYAGAM, S. Non-coding DNA—a brief review. **Journal of Applied Biology & Biotechnology** Vol, v. 5, n. 05, p. 42-47, 2017.

SINGH, P. K.; RAMACHANDRAN, G.; RAMOS-RUIZ, R.; PEIRÓ-PASTOR, R.; ABIA, D.; WU, L. J.; MEIJER, W. J. Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signaling. **PLoS genetics**, v. 9, n. 10, p. e1003892, 2013.

SLAMTI, L.; LERECLUS, D. A cell–cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. **The EMBO journal**, v. 21, n. 17, p. 4550-4559, 2002.

SLAMTI, L.; PERCHAT, S.; HUILLET, E.; LERECLUS, D. Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2239-2255, 2014.

SLAMTI, L.; LEMY, C.; HENRY, C.; GUILLOT, A.; HUILLET, E.; LERECLUS, D. CodY regulates the activity of the virulence quorum sensor PlcR by controlling the import of the signaling peptide PapR in *Bacillus thuringiensis*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1501, 2016.

SMILLIE, C.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; FRANCIÀ, M. V.; ROCHA, E. P.; DE LA CRUZ, F. Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 434-452, 2010.

SMIRNOV, A.; WANG, C.; DREWRY, L. L.; VOGEL, J. Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. **The EMBO journal**, v. 36, n. 8, p. 1029-1045, 2017.

SMITH, A. M.; FUCHS, R. T.; GRUNDY, F. J.; HENKIN, T. Riboswitch RNAs: regulation of gene expression by direct monitoring of a physiological signal. **RNA biology**, v. 7, n. 1, p. 104-110, 2010.

SONG, D.; YANG, Y.; YU, B.; ZHENG, B.; DENG, Z.; LU, B. L.; CHEN, X.; JIANG, T. Computational prediction of novel non-coding RNAs in *Arabidopsis thaliana*. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. S36, 2009.

STORZ, G.; OPDYKE, J. A.; ZHANG, A. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 2, p. 140-144, 2004.

STORZ, G.; VOGEL, J.; WASSARMAN, K. M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. **Molecular cell**, v. 43, n. 6, p. 880-891, 2011.

SUZUKI, M.; HAYASHIZAKI, Y. Mouse-centric comparative transcriptomics of protein coding and non-coding RNAs. **Bioessays**, v. 26, n. 8, p. 833-843, 2004.

ŚWIECICKA, I. Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of *Bacillus thuringiensis* from root voles. **Current microbiology**, v. 46, n. 4, p. 0256-0260, 2003.

ŚWIECICKA, I.; BARTOSZEWICZ, M.; KASULYTE-CREASEY, D.; DREWNOWSKA, J. M.; MURAWSKA, E.; YERNAZAROVA, A.; LUKASZUK, E.; MAHILLON, J. Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates. **FEMS microbiology ecology**, v. 85, n. 2, p. 262-272, 2013.

TAFT, R. J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J. S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. **Bioessays**, v. 29, n. 3, p. 288-299, 2007.

THISTED, T.; GERDES, K. Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: Sok antisense RNA regulates *hok* gene expression indirectly through the overlapping *mok* gene. **Journal of Molecular Biology**, v. 223, n. 1, p. 41-54, 1992.

TOPP, S.; GALLIVAN, J. P. Emerging applications of riboswitches in chemical biology. **ACS chemical biology**, v. 5, n. 1, p. 139-148, 2010.

TRAN, T. T.; ZHOU, F.; MARSHBURN, S.; STEAD, M.; KUSHNER, S. R.; XU, Y. "De novo computational prediction of non-coding RNA genes in prokaryotic genomes," **Bioinformatics**, v. 25, n. 22, p. 2897-2905, 2009.

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D. R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S. L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat Protoc**, v. 7, n. 3, p. 562-78, 2012.

ULVÉ, V. M.; SEVIN, E. W.; CHÉRON, A.; BARLOY-HUBLER, F. Identification of chromosomal alpha-proteobacterial small RNAs by comparative genome analysis and detection in *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 467, 2007.

VAN BELKUM, A. High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. **Clinical microbiology and infection**, v. 9, n. 2, p. 86-100, 2003.

VAN DER AUWERA, G.; TIMMERY, S.; HOTON, F.; MAHILLON, J. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. **International journal of food microbiology**, v. 113, n. 2, p. 164-172, 2007.

VERPLAETSE, E.; SLAMTI, L.; GOHAR, M.; LERECLUS, D. Two distinct pathways lead *Bacillus thuringiensis* to commit to sporulation in biofilm. **Research in microbiology**, v. 168, n. 4, p. 388-393, 2017.

VOGEL, J.; WAGNER, E. G. H. Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 3, p. 262-270, 2007.

VON BODMAN, S. B.; WILLEY, J. M.; DIGGLE, S. P. Cell-cell communication in bacteria: united we stand. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 13, p. 4377-4391, 2008.

VIDAL-QUIST, J. C.; CASTAÑERA, P.; GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitidis capitata*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 19, n. 8, p. 749-759, 2009.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 605-613, 2004.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 6, p. 673-687, 2007.

VILAS-BÔAS, G. T.; ALVAREZ, R. C.; DOS SANTOS, C. A.; VILAS-BOAS, L. A. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

WACHSMUTH, M.; FINDEIß, S.; WEISSHEIMER, N.; STADLER, P. F.; MÖRL, M. De novo design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 4, p. 2541-2551, 2012.

WANG, J.; STEGGLES, J. R.; ELLAR, D. J. Molecular characterization of virulence defects in *Bacillus thuringiensis* mutants. **FEMS microbiology letters**, v. 280, n. 1, p. 127-134, 2008.

WANG, K.; SHU, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A.; ZHANG, J. Systematic characterization of Bacillus Genetic Stock Center *Bacillus thuringiensis* strains using Multi-Locus Sequence Typing. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2018.

WATERS, L. S.; STORZ, G. Regulatory RNAs in bacteria. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 615-628, 2009.

WEN, J.; FOZO, E. M. sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2310-2335, 2014.

WENFEI, Z.; HONGPING, W.; ZHIXIA, X.; YINGHONG, J.; ZHONGQI, W.; JIANGZHAO, Q.; ... NING, W. Mining new *Bt* insecticidal protein genes resource using Illumina sequencing technology. **Bt Research**, v. 5, 2014.

WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 2, p. 182-191, 2009.

XUE, C.; LI, F. Finding noncoding RNA transcripts from low abundance expressed sequence tags. **Cell research**, v. 18, n. 6, p. 695-700, 2008.

YAMAGUCHI, Y.; PARK, J-H.; INOUE, M. Toxin–antitoxin systems in bacteria and archaea. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 61–79, 2011.

ZHANG, A.; WASSARMAN, K. M.; ROSENOW, C.; TJADEN, B. C.; STORZ, G.; GOTTESMAN, S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. **Molecular microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1111-1124, 2003.

ZHANG, Y.; LIU, X. S.; LIU, Q. R.; WEI, L. Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 12, p. 3465-3475, 2006.

ZHANG, Y.; HUANG, H.; ZHANG, D.; QIU, J.; YANG, J.; WANG, K.; ZHU, L.; FAN, J.; YANG, J. A review on recent computational methods for predicting noncoding RNAs. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

ZHONG, C.; PENG, D.; YE, W.; CHAI, L.; QI, J.; YU, Z.; RUAN, L.; SUN, M. Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16025, 2011.

ZHU, L.; PENG, D.; WANG, Y.; YE, W.; ZHENG, J.; ZHAO, C.; HAM, D.; GENG, C.; RUAN, L.; HE, J.; YU, Z.; SUN, M. Genomic and transcriptomic insights into the efficient entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. **Scientific reports**, v. 5, p. 14129, 2015.

3. ARTIGO

PREDIÇÃO, ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE RNAS NÃO CODIFICADORES (ncRNAs) EM *Bacillus thuringiensis*

3.1 RESUMO

A visão clássica do dogma central da biologia molecular passou por mudanças de paradigma na virada deste século, quando avanços, principalmente em análises de bioinformática, contribuíram para a descoberta de que muito do que era transcrito nos organismos eram regiões não traduzidas em proteínas, e que apresentariam função biológica. Tais transcritos foram denominados como RNAs não codificadores (ncRNAs). Motivados por tais descobertas, novos métodos computacionais dedicados à ncRNAs foram propostos, possibilitando estudos de ocorrência e distribuição em genomas de diversos microrganismos. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), uma bactéria com características entomopatogênicas, é utilizada em todo o mundo no controle de pragas e vetores de doenças e ainda não foi analisada com respeito a estas moléculas. A maioria dos processos ligados à virulência, capacidade necrotrófica e esporulação desta bactéria dependem de sistemas *quorum sensing*, porém, estas vias não estão totalmente elucidadas e ncRNAs podem estar atuando junto às mesmas. Desta forma, este trabalho objetivou identificar, analisar e validar ncRNAs em três linhagens dessa espécie. As sequências completas de cromossomos e plasmídeos dos genomas das linhagens Bt407, HD-1 e HD73 foram selecionados. Ao todo, foram identificados 27.111 possíveis ncRNAs; sendo 1.874 candidatos considerados significativos, distribuídos em 177 famílias distintas encontradas principalmente em regiões presentes nas três linhagens. As moléculas identificadas estão envolvidas em processos regulatórios complexos principalmente relacionados à virulência, patogenicidade, resistência e sobrevivência da bactéria. A família epsC teve sua expressão validada no genoma. Os resultados alcançados evidenciam que mesmo bactérias muito relacionadas filogeneticamente podem apresentar diferentes respostas às modificações ambientais, apresentando diferentes padrões de expressão; e ainda levam a uma nova linha de investigação para a compreensão de mecanismos fisiológicos em *B. thuringiensis*.

Palavras-chave: Bioinformática, Regulação gênica, Controle biológico

3.2 INTRODUÇÃO

A visão clássica do dogma central da biologia molecular, vigente até o final do século XX, passou por mudanças de paradigma na virada deste século. Projetos de transcriptomas, avanços em tecnologias de sequenciamento e análises em bioinformática contribuíram para elucidar que muito do que era transcrito nos genomas dos organismos não era traduzido em proteínas e poderiam apresentar função biológica. Estes transcritos foram denominados como RNAs não codificadores (ncRNAs) (BROSNAN; VOINNET, 2009).

Pesquisas recentes indicam que os ncRNAs são muito mais abundantes e importantes do que inicialmente imaginado (LLUCH-SENAR et al., 2015; GOMES et al., 2017). À medida que as pesquisas avançaram foram atribuídos seus papéis biológicos, pressupondo participação na regulação pós-transcricional da expressão gênica, orientação de modificações de RNAs, ajustes fisiológicos em resposta a sinais ambientais, alteração na eficiência de tradução e/ou a estabilidade de RNAm, além de modulação da atividade de proteínas (EDDY, 2001; ULVÉ et al., 2007; WATERS; STORZ, 2009; LI et al., 2012).

Motivados por tais descobertas, novos métodos computacionais dedicados especificamente à análise de ncRNAs foram propostos assegurando a interpretação e elucidação de diversos eventos biológicos. Isso possibilitou o desenvolvimento de estudos em diversos microrganismos como o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), cujas propriedades entomopatogênicas são utilizadas em todo o mundo para o controle de pragas (SANCHIS, 2010; SANAHUJA et al., 2011).

A maioria dos processos ligados à virulência, capacidade necrotrófica e esporulação desta bactéria dependem de sistemas de *quorum sensing* (SLAMTI et al., 2014). Pesquisas em sistemas de comunicação com ação intracelular têm avançado de forma significativa com a caracterização estrutural de diversos reguladores (DECLERCK et al., 2007). Porém, desde que a maioria dos processos de *quorum sensing* não estão completamente esclarecidos, a soma de pesquisas em bioinformática pode, de forma elucidativa, contribuir para o seu entendimento.

Nos últimos anos foram desenvolvidas inúmeras ferramentas para possibilitar a análise de ncRNAs (MACHADO-LIMA; DEL PORTILLO; DURHAM, 2008; BERNHART e HOFACKER, 2009; ZHENG e QU, 2010; BACKOFEN et al., 2017; LAGANÀ; FERRO; CROCE, 2017). No entanto, a sua caracterização ainda é

um campo em aberto e a investigação por meio de novas abordagens é um tema de pesquisa relevante. Neste sentido, a proposta deste trabalho é realizar a detecção, anotação e validação da expressão dessas sequências no genoma de *B. thuringiensis* utilizando ferramentas de bioinformática e biologia molecular para caracterização de ncRNAs com importância para essa espécie.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Softwares: Aplicativos e versões utilizadas

Foram empregados apenas *softwares* de uso livre para análise e processamento dos genomas (TABELA 4).

Tabela 4. Ferramentas utilizadas para predição e análise dos ncRNAs.

Ferramenta	Versão	Classificação	Função
INFERNAL	v1.1.2	Programa	Busca de ncRNAs a partir de homologia de sequências
NCBI	-	Base de dados	Obtenção da sequência completa do genoma das linhagens estudadas
Rfam	v13.0	Base de dados de ncRNAs	Classificação das famílias de ncRNAs
ClicO FS	v2.0	Ferramenta web	Representação circular dos genomas
TargetRNA2	v2.0	Ferramenta web	Predição de alvos para os ncRNAs
UniProt	-	Base de dados	Anotação de proteínas

3.3.2 Mineração de dados: obtenção das sequências dos genomas

Para realização do trabalho, três linhagens de *Bt* foram selecionadas: *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 407, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD73. As sequências completas de seus genomas (TABELA 5), obtidas mediante busca no banco de dados NCBI, possuíam o nível “*Complete Genome*”.

Tabela 5. Linhagens selecionadas e respectivas identificações de acesso às sequências de seus genomas.

Linhagens		
Número de acesso		
Bt407	HD-1	HD73
ASM30674v1	ASM71753v1	ASM33875v1
Cromossomo CP003889.1	Cromossomo CP004870.1	Cromossomo CP004069.1
Plasmídeo BTB_15p CP003892.1	Plasmídeo pBMB14 CP004883.1	Plasmídeo pAW63 CP004072.1
Plasmídeo BTB_2p CP003897.1	Plasmídeo pBMB2062 CP004878.1	Plasmídeo pHT11 CP004073.1
Plasmídeo BTB_502p CP003890.1	Plasmídeo pBMB299 CP004876.1	Plasmídeo pHT7 CP004076.1
Plasmídeo BTB_5p CP003896.1	Plasmídeo pBMB431 CP004877.1	Plasmídeo pHT73 CP004070.1
Plasmídeo BTB_6p CP003895.1	Plasmídeo pBMB46 CP004871.1	Plasmídeo pHT77 CP004071.1
Plasmídeo BTB_78p CP003891.1	Plasmídeo pBMB64 CP004872.1	Plasmídeo pHT8_1 CP004074.1
Plasmídeo BTB_7p CP003894.1	Plasmídeo pBMB65 CP004873.1	Plasmídeo pHT8_2 CP004075.1
Plasmídeo BTB_8p CP003893.1	Plasmídeo pBMB74 CP004874.1	
Plasmídeo BTB_9p CP003898.1	Plasmídeo pBMB7635 CP004879.1	
	Plasmídeo pBMB8240 CP004880.1	
	Plasmídeo pBMB8513 CP004881.1	
	Plasmídeo pBMB95 CP004875.1	
	Plasmídeo pBMBlin15 CP004882.1	

3.3.3 Anotação

A anotação de ncRNAs foi realizada utilizando o programa *cmsearch* do pacote INFERNAL v1.1.2 – INFERENCE OF RNA ALIGNMENT (NAWROCKI et al., 2009), com modelos de covariância presentes no banco de dados Rfam v13.0 (KALVARI et al., 2017). Utilizou-se, por padrão, os limites de inclusão máximos de 0,01 de *e-value* para considerar o ncRNA encontrado como significativo. Para os valores que ultrapassaram esse limite, a sequência foi considerada não significativa. Em caso de sobreposição de famílias, aquela com o menor *e-value* foi selecionada e, em caso de empate de *e-value*, a família com o maior *score* foi escolhida (NAWROCKI; EDDY, 2016).

3.3.4 Distribuição das famílias de ncRNAs nos genomas analisados

As coordenadas dos ncRNAs foram extraídas do arquivo de saída e classificadas em três classes quanto à presença nos genomas das linhagens trabalhadas (I) **Núcleo**: regiões presentes em todos os genomas; (II) **Exclusivas**: regiões presentes somente em um único genoma; (III) **Compartilhadas**: regiões presentes no genoma de duas linhagens.

Para a visualização da distribuição geral das regiões genômicas e dos ncRNAs identificados, os dados de anotações obtidos foram plotados com a ferramenta ClicO FS v2.0 (KRZYWINSKI et al., 2009; CHEONG et al., 2015).

3.3.5 Estudos de expressão

3.3.5.1 Seleção do ncRNA

A partir da análise das distribuições dos ncRNAs nos genomas analisados e suas respectivas funções previstas pelo banco de dados Rfam, o ncRNA epsC, já identificado como responsável pela síntese de exopolissacarídeos no gênero *Bacillus* (LEOFF et al., 2008; IRNOV; WINKLER, 2010; WEINBERG et al., 2010) foi identificado nas três linhagens analisadas e selecionado para validação de expressão em cultura líquida.

3.3.5.2 Predição de alvos do ncRNA

O ncRNA epsC foi inicialmente avaliado quanto à busca de alvos, realizada pelo programa TargetRNA2 (KERY et al., 2014). Para tal, a ferramenta utilizou uma variedade de características e recursos, comparando a sequência do ncRNA a ser avaliado com a sequência do genoma bacteriano selecionado para pesquisa.

A primeira característica avaliada foi a conservação do ncRNA via algoritmo BLASTn (JOHNSON et al., 2008) afim de comparar a sequência destes com dados bacterianos disponíveis. Para todas as sequências significativamente semelhantes encontradas, um alinhamento múltiplo de sequências foi realizado com o programa ClustalW2 (LARKIN et al., 2007). A partir do alinhamento, as entropias posicionais foram computadas e utilizadas para identificar regiões altamente conservadas, consideradas pelo TargetRNA2 mais propensas a serem regiões alvo de interação.

A segunda característica analisada é a acessibilidade das regiões na estrutura secundária das moléculas. O programa RNAfold (BERNHART;

HOFACKER; STADLER, 2005) analisa as moléculas do ncRNA e dos RNAm afim de determinar a probabilidade de que as regiões de ligação estejam acessíveis em suas estruturas secundárias. As regiões mais acessíveis são consideradas mais propensas a serem regiões alvo de interação.

Por fim, é avaliada a energia da hibridação, onde a ferramenta RNAduplex (LORENZ et al., 2011) determina regiões do ncRNA que possuem baixa energia de hibridação com o RNAm alvo candidato. Os RNAm que possuem uma ou mais regiões com baixa energia de hibridação para uma ou mais regiões do ncRNA são considerados mais propensos a serem alvo.

Após avaliar todos os RNAm do genoma especificado, é fornecida uma lista de alvos regulatórios prováveis classificados pela probabilidade de se observar uma forte interação ao acaso (*p-value*). São considerados como significativos os RNAm com *p-value* <0,05 sendo que, quanto menor o *p-value* maiores as probabilidades de serem sítios alvo (KERY et al., 2014).

Para cada alvo identificado, uma representação gráfica da interação ncRNA-RNAm é apresentada juntamente com informações sobre a energia termodinâmica (kcal/mol) de hibridação entre as duas moléculas. O programa ainda é capaz de considerar a expressão de genes diferenciais melhorando significativamente a precisão das identificações (KERY et al., 2014).

3.3.5.3 Linhagens de *Bacillus thuringiensis*

Para realização do estudo de expressão foram utilizadas as mesmas linhagens das análises de bioinformática presentes no laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

3.3.5.4 Extração de RNA total

Visando validar a expressão do gene do ncRNA selecionado, as linhagens de *B. thuringiensis* 407, HD-1 e HD73 foram cultivadas em meio LB (Luria Bertani) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) a 37 °C com 140 rpm de agitação orbital até entrada em fase estacionária. Em seguida, amostras de RNA total das três linhagens foram extraídas nos tempos T-1 e T0 (final de fase logarítmica de crescimento, e início de fase estacionária, respectivamente) utilizando o kit illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare Life Sciences), com adaptações.

Ao todo, 8 mL de cada cultura foram centrifugados a 10.000 xg a 4 °C. Posteriormente foram adicionados 350 μ L de tampão de lise (presente no kit); 3,5 μ L de β -mercaptoetanol e pérolas de vidro (2 mm), afim de lisar as células após agitação em vórtex. O material lisado foi colocado em coluna de filtração para redução da viscosidade e purificação. Ao filtrado, foram adicionados 350 μ L de etanol e levado ao vórtex. Em seguida, as amostras foram colocadas em nova coluna de filtração, onde após centrifugação de 8.000 xg /30 segundos, devido ação do etanol, o RNA ficou adsorvido à membrana de sílica. À membrana, foram adicionados 350 μ L de tampão de dessalinização e, posteriormente, levada a nova centrifugação a 11.000 xg /1 minuto. Para digestão do DNA presente na amostra, 95 μ L de DNase presente no kit foram adicionados permanecendo em incubação em temperatura ambiente por 30 minutos.

Posteriormente, as amostras passaram por três etapas de purificação e centrifugação com tampões diferentes. Por fim, à coluna foram adicionados 50 μ L de água ultrapura *RNase free*, onde, após centrifugação a 11.000 xg /1 minuto o RNA foi eluído e armazenado em refrigerador a -80 °C.

3.3.5.5 Quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA

A quantificação e verificação de pureza das amostras de RNA total foram obtidas através de espectrofotômetro Synergy HT (BioTek) e confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TEB (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e, visualizado em sistema digital L-Pix Image (Loccus Biotecnologia).

3.3.5.6 PCR de Transcrição Reversa em Tempo Real (qRT-PCR)

A sequência do ncRNA obtida do programa INFERNAL foi analisada com auxílio do programa MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), possibilitando a construção dos iniciadores *Forward* (5' AACCCATCCTCACGTCATAC 3') e *Reverse* (5' TGGTGATGTCTCCTAACCGT 3'). O programa GeneRunner v5.1.01 foi utilizado para avaliação quanto a possível formação de dímeros e estruturas secundárias. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento Rotor-Gene Q 5 Plex (Qiagen) utilizando o kit QuantiNova SYBR Green RT-PCR (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Essas reações foram realizadas com 100 ng de RNA, iniciadores em

concentração de 2 μ M e volume final de reação de 20 μ l. As condições de ciclagem foram de 10 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 70°C e 30 segundos a 72 °C, seguidos de análise de curva de *melting* (50 a 75 °C a 0,5 °C / segundo). O ensaio foi realizado em duplicata e reações com amostras sem RNA foram realizadas como controle negativo. O gene *rpoB*, responsável por codificar a subunidade β da RNA polimerase (KO et al., 2007) foi utilizado como normalizador da reação como anteriormente descrito em literatura (QI et al., 2001).

A análise estatística dos valores dos ciclos de quantificação das amostras foi realizada com o *software* REST 2009 v2.0.13 (Qiagen).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Predição e avaliação dos ncRNAs identificados

Após análise das sequências dos genomas, o programa INFERNAL encontrou ao todo 27.111 possíveis moléculas de ncRNAs nos três genomas e considerou 1.874 como significativos (limites de inclusão máximos de 0,01 de *e-value*); sendo 624 na linhagem Bt407, 656 em HD-1 e 594 em HD73 (TABELA 6).

Os resultados permitiram identificar 177 famílias de ncRNAs diferentes distribuídas nos genomas analisados. Destas, 143 foram encontradas exclusivamente nos cromossomos, 16 exclusivamente em plasmídeos e 18 em ambos os tipos de replicons (FIGURA 4). As famílias com maior número de representantes foram a tRNA e T-box, com 346 e 136 moléculas, respectivamente.

Tabela 6. Famílias de ncRNAs significativos identificadas nas análises dos genomas das linhagens de *B. thuringiensis* 407, HD-1 e HD-73.

Identificador*	Família	Localização	Número de sequências			
			Total	Linhagens		
				Bt407	HD-1	HD73
1	5S_rRNA	Cromossomo	39	14	13	12
2	5_8S_rRNA	Cromossomo	40	14	14	12
3	tRNA	Plasmídeo e Cromossomo	346	143	98	105
4	U12	Cromossomo	1	1	0	0
5	RNaseP_bact_a	Cromossomo	3	1	1	1
6	RNaseP_bact_b	Cromossomo	3	1	1	1
7	U3	Plasmídeo e Cromossomo	2	2	0	0
8	6S	Cromossomo	6	2	2	2
9	Metazoa_SRP	Cromossomo	3	1	1	1
10	GcvB	Cromossomo	2	0	1	1

11	tmRNA	Plasmídeo e Cromossomo	19	8	5	6
12	U6	Plasmídeo	1	0	1	0

Identificador*	Família	Localização	Número de seqüências			
			Total	Linhagens		
				Bt407	HD-1	HD73
13	let-7	Cromossomo	1	1	0	0
14	Intron_gpl	Cromossomo	7	2	2	3
15	Intron_gpII	Plasmídeo e Cromossomo	57	4	34	19
16	Histone3	Cromossomo	5	1	2	2
17	FMN	Cromossomo	6	2	2	2
18	TPP	Cromossomo	22	8	7	7
19	yybP-ykoY	Cromossomo	6	2	2	2
20	CsrC	Plasmídeo e Cromossomo	13	3	5	5
21	S15	Cromossomo	3	1	1	1
22	IS128	Cromossomo	4	1	2	1
23	mir-6	Cromossomo	2	0	1	1
24	SAM	Cromossomo	50	18	16	16
25	PrrB_RsmZ	Cromossomo	2	0	1	1
26	Purine	Cromossomo	21	7	7	7
27	Lysine	Cromossomo	12	4	4	4
28	Bacteria_small_SRP	Cromossomo	3	1	1	1
29	Cobalamin	Cromossomo	3	1	1	1
30	SSU_rRNA_bacteria	Cromossomo	40	14	14	12
31	T-box	Cromossomo	136	45	45	46
32	glmS	Cromossomo	3	1	1	1
33	ctRNA_pGA1	Cromossomo	2	0	1	1
34	ctRNA_pND324	Plasmídeo	1	1	0	0
35	sar	Cromossomo	2	0	1	1
36	snoZ221_snoR21b	Cromossomo	4	2	1	1
37	snoZ165	Cromossomo	1	1	0	0
38	sroD	Cromossomo	1	1	0	0
39	ydaO-yuaA	Cromossomo	12	4	4	4
40	ykoK	Cromossomo	12	2	5	5
41	IBV_D-RNA	Cromossomo	1	1	0	0
42	mir-172	Cromossomo	1	0	1	0
43	Glycine	Cromossomo	3	1	1	1
44	Thr_leader	Plasmídeo e Cromossomo	44	13	17	14
45	Leu_leader	Cromossomo	17	6	5	6
46	His_leader	Cromossomo	3	1	1	1
47	PyrR	Cromossomo	12	4	4	4
48	ylbH	Plasmídeo e Cromossomo	8	3	3	2
49	PreQ1	Cromossomo	6	2	2	2
50	L13_leader	Cromossomo	3	1	1	1
51	L19_leader	Cromossomo	3	1	1	1
52	L10_leader	Cromossomo	3	1	1	1
53	L20_leader	Cromossomo	8	2	3	3
54	L21_leader	Plasmídeo e Cromossomo	4	2	1	1
55	SNORD69	Cromossomo	4	1	2	1
56	U6atac	Cromossomo	2	0	1	1
57	NRON	Cromossomo	2	0	1	1
58	MIR159	Plasmídeo	1	1	0	0
59	MIR169_2	Cromossomo	2	0	1	1
60	mir-153	Cromossomo	2	0	2	0

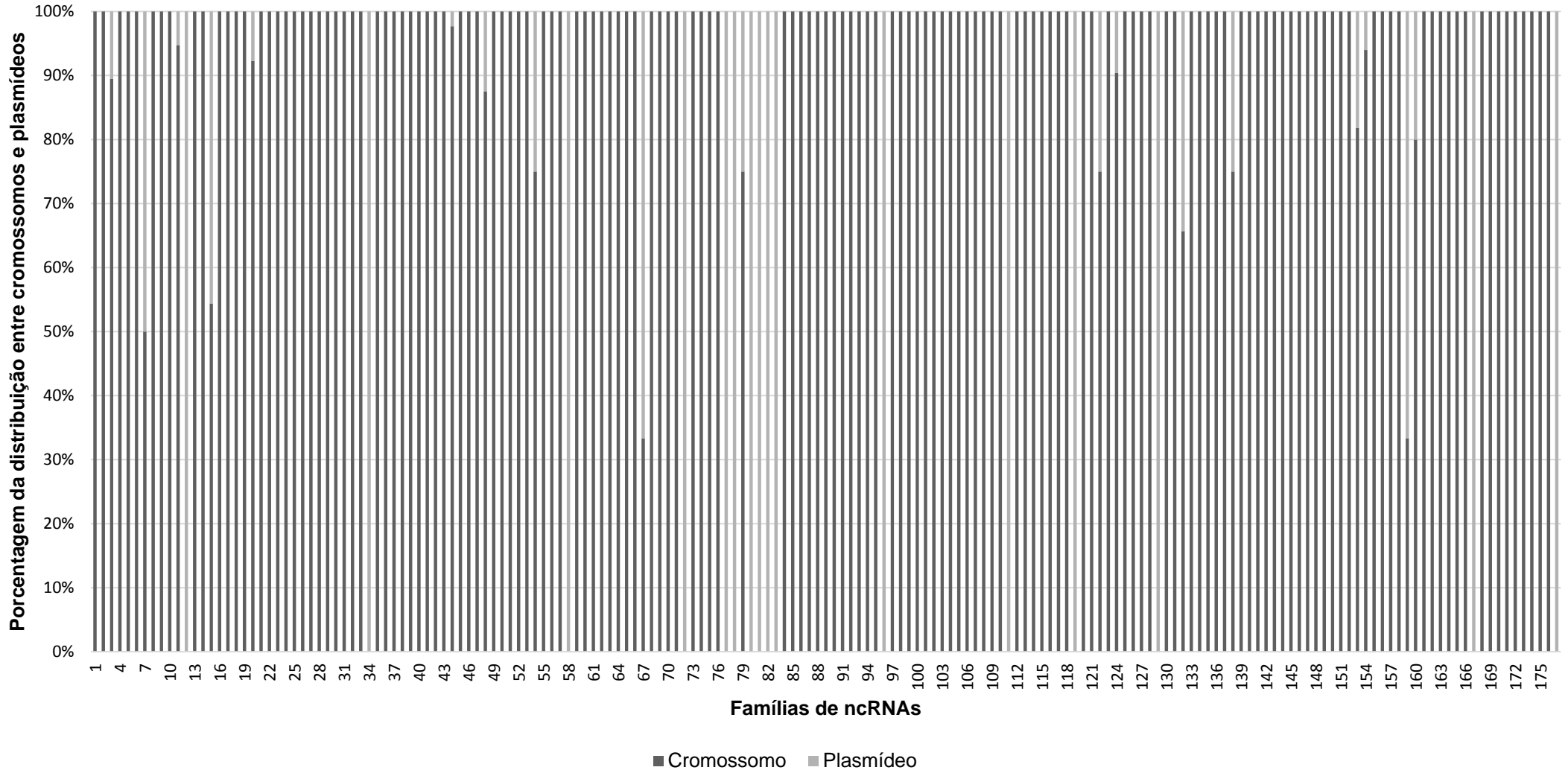
61	mir-302	Cromossomo	2	0	1	1
62	MIR390	Cromossomo	2	0	2	0
			Número de sequências			
Identificador*	Família	Localização	Total	Linhagens		
				Bt407	HD-1	HD73
63	mir-147	Cromossomo	1	1	0	0
64	mir-202	Cromossomo	3	1	2	0
65	mir-451	Cromossomo	2	2	0	0
66	mir-81	Cromossomo	1	0	1	0
67	mir-308	Plasmídeo e Cromossomo	3	1	2	0
68	mir-454	Cromossomo	2	0	1	1
69	mir-14	Cromossomo	6	2	2	2
70	mir-299	Cromossomo	5	3	1	1
71	mir-335	Cromossomo	1	1	0	0
72	mir-287	Plasmídeo	1	0	1	0
73	lsy-6	Cromossomo	1	1	0	0
74	mir-374	Cromossomo	2	2	0	0
75	MIR158	Cromossomo	2	0	1	1
76	mir-259	Cromossomo	1	1	0	0
77	mir-233	Plasmídeo	1	0	1	0
78	mir-423	Plasmídeo	1	0	1	0
79	mir-787	Plasmídeo e Cromossomo	4	0	2	2
80	MIR1122	Plasmídeo	3	2	1	0
81	MIR529	Plasmídeo	1	1	0	0
82	mir-883	Plasmídeo	1	0	1	0
83	mir-876	Plasmídeo	1	0	1	0
84	mir-434	Cromossomo	2	0	2	0
85	MIR1444	Cromossomo	1	1	0	0
86	mir-556	Cromossomo	13	6	3	4
87	mir-578	Cromossomo	9	1	5	3
88	mir-583	Cromossomo	1	1	0	0
89	mir-553	Cromossomo	6	2	2	2
90	mir-1255	Cromossomo	3	1	1	1
91	MIR530	Cromossomo	3	1	2	0
92	c-di-GMP-I	Cromossomo	8	4	2	2
93	PK-G12rRNA	Cromossomo	40	14	14	12
94	snR77	Cromossomo	3	1	1	1
95	snR58	Cromossomo	2	0	1	1
96	STnc150	Plasmídeo	1	0	0	1
97	STnc490	Cromossomo	2	0	1	1
98	STnc250	Cromossomo	4	0	2	2
99	BsrC	Cromossomo	6	2	2	2
100	BsrF	Cromossomo	3	1	1	1
101	miR-430	Cromossomo	5	3	1	1
102	NrrF	Cromossomo	2	0	1	1
103	S_pombe_snR42	Cromossomo	1	1	0	0
104	rli40	Cromossomo	6	2	2	2
105	rli45	Cromossomo	2	0	1	1
106	rli48	Cromossomo	2	0	1	1
107	AdoCbl_riboswitch	Cromossomo	3	1	1	1
108	rli61	Cromossomo	3	1	1	1
109	rliD	Cromossomo	3	1	1	1
110	plasmodium_snoR31	Cromossomo	3	1	1	1
111	Bacillus-plasmid	Plasmídeo	9	4	3	2

112	Pedo-repair	Cromossomo	2	0	1	1
Identificador*	Família	Localização	Número de seqüências			
			Total	Linhagens		
				Bt407	HD-1	HD73
113	SAM-I-IV-variant	Cromossomo	3	1	1	1
114	crcB	Cromossomo	4	2	1	1
115	epsC	Cromossomo	3	1	1	1
116	pan	Cromossomo	3	1	1	1
117	yjdF	Cromossomo	3	1	1	1
118	cspA	Cromossomo	18	6	6	6
119	greA	Plasmídeo	1	1	0	0
120	rimP	Cromossomo	1	1	0	0
121	MicX	Cromossomo	12	4	4	4
122	RsaE	Plasmídeo e Cromossomo	4	1	2	1
123	RsaJ	Cromossomo	1	1	0	0
124	tRNA-Sec	Plasmídeo e Cromossomo	73	33	18	22
125	Bacteria_large_SRP	Cromossomo	3	1	1	1
126	Archaea_SRP	Cromossomo	3	1	1	1
127	Phe_leader	Cromossomo	12	3	5	4
128	MIR2118	Cromossomo	2	0	2	0
129	mir-2807	Plasmídeo	1	0	1	0
130	SSU_rRNA_archaea	Cromossomo	40	14	14	12
131	SSU_rRNA_eukarya	Cromossomo	40	14	14	12
132	group-II-D1D4-1	Plasmídeo e Cromossomo	73	4	39	30
133	sraA	Cromossomo	5	1	2	2
134	STnc40	Cromossomo	4	1	1	2
135	STnc50	Cromossomo	2	0	1	1
136	STnc350	Cromossomo	2	0	1	1
137	STnc370	Cromossomo	4	2	1	1
138	STnc320	Plasmídeo e Cromossomo	4	2	1	1
139	STnc230	Cromossomo	1	0	1	0
140	STnc540	Cromossomo	1	1	0	0
141	rivX	Cromossomo	1	1	0	0
142	MESTIT1_2	Cromossomo	2	0	1	1
143	XIST_A_REPEAT	Cromossomo	2	0	1	1
144	FsrA	Cromossomo	3	1	1	1
145	TtnuCD19	Cromossomo	3	1	1	1
146	TtnuHACA18	Cromossomo	2	0	1	1
147	GlsR16_miR3	Cromossomo	1	1	0	0
148	psRNA14	Cromossomo	2	2	0	0
149	PyrG_leader	Cromossomo	2	2	0	0
150	SR1	Cromossomo	9	3	3	3
151	SurA	Cromossomo	5	2	1	2
152	sau-19	Cromossomo	1	1	0	0
153	sau-50	Plasmídeo e Cromossomo	11	3	5	3
154	sau-5971	Plasmídeo e Cromossomo	33	5	13	15
155	NsiR1	Cromossomo	3	1	1	1
156	snoR125	Cromossomo	1	0	1	0
157	SpF22_sRNA	Cromossomo	2	0	1	1
158	SpF25_sRNA	Cromossomo	4	2	1	1
159	SpF43_sRNA	Plasmídeo e Cromossomo	3	1	1	1
160	ncr1015	Plasmídeo e Cromossomo	5	2	2	1
161	ncr1175	Cromossomo	2	0	1	1

162	ncr1241	Cromossomo	3	1	1	1
163	ncr1575	Cromossomo	8	2	3	3
164	ohsC_RNA	Cromossomo	1	1	0	0
			Número de seqüências			
Identificador*	Família	Localização	Total	Linhagens		
				Bt407	HD-1	HD73
165	Atu_C9	Cromossomo	14	4	5	5
166	5_ureB_sRNA	Cromossomo	2	0	1	1
167	ToxI	Plasmídeo	12	2	5	5
168	mir-965	Cromossomo	3	2	0	1
169	LSU_rRNA_archaea	Cromossomo	40	14	14	12
170	LSU_rRNA_bacteria	Cromossomo	40	14	14	12
171	SSU_rRNA_microsporidia	Cromossomo	40	14	14	12
172	LSU_rRNA_eukarya	Cromossomo	40	14	14	12
173	mt-tmRNA	Cromossomo	3	1	1	1
174	Spy1186876	Cromossomo	1	1	0	0
175	Spy392987	Cromossomo	1	1	0	0
176	BSnc120	Cromossomo	25	7	9	9
177	EF3314_EF3315	Plasmídeo	1	0	1	0
TOTAL			1.874	624	656	594

*Numeração também utilizada na Figura 4

Figura 4. Representação da distribuição geral das famílias de ncRNAs identificadas nas três linhagens*.



*Comparação entre o percentual de presença das moléculas no cromossomo e nos plasmídeos.

A FIGURA 4 evidencia a grande variação de localização das famílias de ncRNAs identificadas neste estudo. Por exemplo, os ncRNAs FMN (17) e *Bacillus-plasmid* (111) tiveram todas suas moléculas identificadas no cromossomo e em plasmídeos, respectivamente; enquanto 54% das moléculas do ncRNA *Intron_gpII* (15) foram identificadas nos cromossomos e 46% em plasmídeos. Aliás, entre as famílias que compartilham a localização de suas sequências em ambos replicons, existiu uma grande variabilidade percentual como foi o caso de *Thr_leader* (44), com 97% da sua localização no cromossomo, ao contrário de *mir-308* (67) e *SpF43_sRNA* (159) que apresentaram 67% de sua localização em plasmídeos, sendo estas, as maiores variações percentuais dentre todas as famílias.

Das 177 famílias de ncRNAs identificadas, onze já tiveram seu papel funcional descrito como estando relacionadas à virulência, metabolismo de ferro, homeostase, síntese de compostos e controle do número de cópias de plasmídeos.

O sRNA *RsaE* presente nos três genomas analisados, identificado primeiramente em *Staphylococcus aureus* (GEISSMANN et al., 2009), demonstrou ter sua expressão ativada por estresse oxidativo, altas concentrações de sal e sistema de *quorum sensing* na linhagem RN6390, desempenhando papel importante na virulência da espécie (GEISSMANN et al., 2009; BOHN et al., 2010). Análises de transcriptoma e proteoma de linhagens com deleção do gene *rsaE* ou após super expressão apontaram regulação na expressão de genes envolvidos no metabolismo central, principalmente na síntese de folato e no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) (GEISSMANN et al., 2009; BOHN et al., 2010). Este ncRNA foi identificado em *Bacillus subtilis* como *ncr22* por RASMUSSEN; NIELSEN e JARMER (2009) e IRNOV e colaboradores (2010). Por controlar de forma antisense a expressão de genes com funções relacionadas ao estresse oxidativo e reações de oxidação-redução foi descrito também como *RoxS* (**R**elated to **O**xidative **S**tress) na mesma espécie (DURAND et al., 2015).

O *riboswitch* dinucleotídeo c-di-GMP cíclico (c-di-GMP-I) também identificado nas três linhagens, é uma molécula de sinalização intracelular que regula processos de motilidade, patogênese e formação de biofilmes em espécies bacterianas, permitindo que esses organismos se adaptem ao ambiente (SMITH; LIPCHOCK; STROBEL, 2011; VALENTINI; FILLOUX, 2016). No caso de agentes patogênicos, a formação de biofilme correlaciona-se com infecções crônicas profundamente enraizadas e resistência à fagocitose e a agentes antimicrobianos

(HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). Os determinantes de biofilme modulados por este ncRNA variam desde a rotação de flagelos à retração de pili tipo IV, produção de exopolissacarídeos, expressão de adesina superficial, resistência antimicrobiana e outras respostas ao estresse, produção de metabólitos secundários e dispersão de biofilmes (RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013). Em *B. thuringiensis* BMB171, foram identificados dois representantes desta família de *Riboswitches* denominados RNA Bc1 e RNA Bc2 (TANG et al., 2016). Estes ncRNAs estão localizados na região 5' UTR de RNAm codificadores de proteínas quimiotáticasceptoras de metil (MCP) e proteínas de adesão a colágeno (Cap), respectivamente.

A proteína Cap é capaz de interagir com o colágeno de tecidos animais afetando a colonização bacteriana, persistência e virulência, sendo considerada um importante fator de virulência para muitos organismos Gram-positivos, isso porque a adesão às superfícies das células hospedeiras e a colonização nos tecidos são passos críticos para infecção microbiana e sobrevivência (XU et al., 2004; VENGADESAN; NARAYANA, 2011; MILLER et al., 2015). Estes ncRNAs ainda tiveram sua associação comprovada com secreção de exopolissacarídeos, formação de biofilmes e virulência de *B. thuringiensis* BMB171 contra *Helicoverpa armigera* (TANG et al., 2016).

O sRNA MicX identificado nas três linhagens é caracterizado com importância para virulência e proliferação de *Vibrio cholerae*, regulando a expressão de *vc0972*, que codifica uma proteína de membrana externa (OMP), e *vc0620*, que codifica um componente periplasmático de um transportador ABC (DAVIS; WALDOR, 2007). Abordagens sugerem que a regulação de ambos é uma consequência das interações diretas entre o MicX e as sequências próximas aos locais de início de tradução dos RNAm. A sequência de MicX se sobrepõe ao gene *vc0620* e, portanto, pode ser esperada uma instabilidade do RNAm, e ainda, inibição da tradução na região 3' UTR (DAVIS; WALDOR, 2007). Sendo assim, o emparelhamento do sRNA ao RNAm pode inibir a ligação do ribossomo e, conseqüentemente a tradução, tornando os transcritos mais suscetíveis à digestão por nucleases. Embora MicX funcione como um regulador de *vc0972* e *vc0620*, sua contribuição geral para a fisiologia de *V. cholerae* continua a ser investigada. Nenhum dos dois alvos foi bem caracterizado, portanto, as conseqüências de sua expressão desregulada são desconhecidas. Além de ser expresso em diversas

condições testadas, a exclusão e superexpressão de MicX não parecem prejudicar o microrganismo (DAVIS; WALDOR, 2007).

Caracterizado neste trabalho como específico do genoma da linhagem Bt407, o ncRNA rivX desempenha papel crítico na expressão dos dois principais fatores de virulência de *Streptococcus pyogenes*, o sistema de transdução de sinal de dois componentes CovR/S e o regulador Mga (CHURCHWARD, 2007; ROBERTS; SCOTT, 2007). CovR é uma proteína reguladora de resposta que reprime a transcrição de genes essenciais para síntese da cápsula de ácido hialurônico (LEVIN; WESSELS, 1998), bem como múltiplos genes que codificam fatores de virulência adicionais (BERNISH; VAN DE RIJN, 1999; FEDERLE; MCIVER; SCOTT, 1999; HEATH et al., 1999). O regulador Mga é responsável pela expressão dos genes *scpA*, *sic* e *fba*, codificadores de proteínas relacionadas a virulência; e de *scl1*, que codifica uma proteína semelhante ao colágeno (SIMPSON et al., 1990; OKADA; GEIST; CAPARON, 1993; KIHLEBERG et al., 1996; LUKOMSKI et al., 2001; TERAO et al., 2001). RivX e a proteína codificada pelo gene a jusante, *rivR* ativam o regulador Mga, controlando a expressão de uma série de reguladores e fatores associados à virulência (ROBERTS; SCOTT, 2007).

O ncRNA PrrB_RsmZ, identificado no genoma das linhagens HD-1 e HD73, está associado a um sistema de transdução de sinal de dois componentes. O primeiro deles, GacS-GacA, controla a produção de metabólitos secundários e o segundo, enzimas extracelulares envolvidas na patogenicidade de bactérias Gram-negativas (HEEB; HAAS, 2001). Em *E. coli*, a semelhança da estrutura secundária deste ncRNA com o sRNA CsrB e a presença de três sequências GGA nas alças, levou AARONS e colaboradores (2000) a sugerirem que este RNA pode interagir com uma proteína semelhante a CsrA, que possui efeito regulatório sobre a biossíntese de glicogênio, glicólise, formação de biofilmes e detecção de *quorum sensing* (LIU et al., 1997; JACKSON et al., 2002; SONNLEITNER; ROMEO; BLÄSI, 2012).

Outras duas famílias de ncRNAs identificadas estão relacionadas ao metabolismo de ferro. O sRNA FsrA, presente nas três linhagens analisadas, foi descrito por GABALLA e colaboradores (2008) em *B. subtilis* atuando em um sistema de resposta de economia de ferro, sendo sua ação dependente, em parte, de três pequenas proteínas designadas como proteínas básicas reguladas por Fur (Fbp).

O ferro é um elemento essencial para quase todas as células vivas, mas devido à insolubilidade dos hidróxidos férricos é um nutriente limitante em muitos ambientes (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Afim de otimizar seu crescimento em condições com limitação de ferro, as bactérias desenvolveram uma variedade de mecanismos que incluem a produção de sideróforos e sistemas de absorção de complexos de ferro (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004). O repressor de absorção férrica (Fur) reprime a expressão dos sistemas de absorção de ferro em resposta à suficiência de ferro através da ação conjunta do ncRNA FsrA e da proteína FbpB (SMALDONE et al., 2012).

O sRNA NrrF, identificado no genoma das linhagens HD-1 e HD73, apresenta ligação ao controle Fur em *Neisseria meningitidis*, sendo sintetizado sob condições de limitação de ferro, regulando os genes da succinato desidrogenase *sdhA* e *sdhC* (MELLIN et al., 2007). No entanto, além da sua ligação ao metabolismo de ferro, um estudo recente de PANNEKOEK e colaboradores (2017) identificou outro alvo deste ncRNA, o RNAm *petABC*. Este é responsável por codificar citocromo *bc1* (componente essencial da cadeia respiratória de *N. meningitidis*) onde, a interação entre NrrF e a região 5' UTR do RNAm resulta em sua repressão.

Outro ncRNA caracterizado como importante ao metabolismo bacteriano é o sRNA *ohsC* (**o**ppression **h**ydrophobic **O**RF **s**RNA) identificado como exclusivo do cromossomo da linhagem Bt407. Esse ncRNA pertence a um sistema toxina-antitoxina ShoB-OhsC, semelhante ao sistema *hok/sok* sendo descoberto em uma estratégia de clonagem para identificar novos sRNAs em *E. coli* (KAWANO et al., 2005). Estes autores detectaram que os dois RNAs pertencentes a este sistema são codificados na mesma região intergênica (*yfhL-acpS*) e compartilham complementaridade de 19 nucleotídeos na região 5' do RNAm ShoB (**s**hort **h**ydrophobic **O**RF) (FOZO et al., 2008).

O gene *shoB* codifica uma proteína hidrofóbica de 26 aminoácidos enquanto o gene *ohsC* codifica o sRNA. A proteína codificada pelo gene *shoB* é considerada letal quando produzida em excesso por causar danos na membrana celular. Dessa forma, o sRNA é responsável por regular seus níveis intracelulares (FOZO et al., 2008), o que ocorre via ligação de OhsC à região 5'-UTR do RNAm, impedindo a sua tradução (FOZO, 2012). A expressão dos dois RNAs difere dependendo da condição de crescimento. Por exemplo, a antitoxina OhsC é altamente expressa em fase estacionária. Porém, a expressão de *shoB* é baixa sob essa condição, mas alta

durante a fase exponencial, onde OhsC acaba por apresentar uma baixa expressão (KAWANO et al., 2005; FOZO et al., 2008). O papel biológico de ShoB em bactérias não é bem compreendido. No entanto, quando super expresso, induz a expressão de diversos genes envolvidos em respostas ao estresse e transporte de açúcar em *E. coli*. O motivo da indução destes genes não é claro, mas pode estar relacionado ao dano causado na membrana ou até mesmo ao fato de ShoB estar envolvido no metabolismo ou síntese de macromoléculas (FOZO, 2012).

A identificação do sRNA OhsC na linhagem Bt407 é a primeira descrição desse ncRNA em um gênero bacteriano que não seja *Escherichia* ou *Shigella*, uma vez que a distribuição do loco onde este sistema é codificado seria limitada a estes gêneros (KAWANO et al., 2005; FOZO et al., 2008; 2010). Desta forma, o papel biológico desse sRNA na linhagem Bt407 pode ser diferente do descrito anteriormente.

O ncRNA PyrG leader, identificado como exclusivo da linhagem Bt407 é responsável por reprimir CTP sintetase, enzima envolvida na biossíntese de pirimidina de *B. subtilis*. Este ncRNA localizado na região 5'UTR do RNAm atua causando terminação prematura da transcrição ou inibindo a tradução através da formação de um *hairpin* (MENG; SWITZER, 2002; TURNBOUGH; SWITZER, 2008). MENG; SWITZER (2001) demonstraram que a tradução de *pyrG* é reprimida por níveis elevados de citidina. Estes autores propuseram, em um trabalho complementar, que quando os níveis intracelulares de CTP sintetase estão baixos, uma proteína chamada PyrR evita a formação do grampo anti-terminador causada pelo ncRNA, possibilitando a tradução do RNAm (MENG; SWITZER, 2002; TURNBOUGH; SWITZER, 2008).

O RNA *cspA*, identificado nas três linhagens estudadas é um *Riboswitch* localizado na região 5'UTR do RNAm do gene *cspA*. Este elemento em *E. coli*, regulando a expressão de *cspA* em resposta à temperatura desempenhando assim, função na homeostase (GIULIODORE, 2010). Em temperaturas inferiores a 20 °C, o ncRNA realiza um rearranjo estrutural no RNAm, tornando a região Shine-Dalgarno mais acessível ao ribossomo facilitando o processo de tradução. Em baixas temperaturas, a “estrutura de choque a frio” é traduzida de forma mais eficiente e torna-se menos suscetível à degradação que a estrutura comum encontrada a 37 °C (BREAKER, 2010; GIULIODORE, 2010).

Outra importante função dos ncRNAs é o controle do número de cópias de plasmídeos, regulando de forma negativa a região *Repl* plasmidial, responsável por sua replicação (KIM; MEYER, 1986). Neste trabalho identificamos o *Bacillus-plasmid*, caracterizado em espécies dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* (WEINBERG, 2010). Este regulador foi encontrado nos plasmídeos BTB_5p, BTB_7p, BTB_9p e BTB_78p da linhagem Bt407; pBMB64, pBMB7635 e pBMB8513 da linhagem HD-1; e pHT17, pHT8_1 de HD73.

Desta forma, nossos resultados permitiram a identificação de um elevado número de famílias de ncRNAs com papel biológico já descrito em diversos gêneros e espécies bacterianas. É possível que algumas das interações descritas acima ocorram também nas linhagens pesquisadas, como é o caso do ncRNA RsaE, que já foi identificado em *B. subtilis* e cuja sequência possui alta afinidade (100% de cobertura e identidade, segundo resultados da ferramenta Blast) com o gene que codifica a proteína tiorredoxina, uma oxirredutase (ARNÉR, 2018).

No entanto, alguns dos papéis biológicos desempenhados pelos ncRNAs acima descritos podem não ocorrer nas linhagens de *Bt* trabalhadas, como é o caso do OhsC, cujo locus do sistema regulado por esta molécula ainda não foi identificado em outro gênero bacteriano que não seja *Escherichia* ou *Shigella*.

3.4.2 Distribuição geral dos ncRNAs nos genomas

Dentre os ncRNAs identificados como significativos, 1.745 distribuídos em 98 famílias foram classificados como Núcleo, ou seja, estavam presentes em todas as linhagens, preferencialmente se localizando no cromossomo (FIGURA 5, ANEXO 1), 56 representantes de 47 famílias foram denominados Exclusivos, por estarem presentes em apenas 1 linhagem e 73 representantes de 32 famílias como Compartilhados, por serem identificados em duas das três linhagens analisadas (TABELAS 7 e 8).

Tabela 7. Classificação das famílias de ncRNAs segundo a presença nos genomas de *B. thuringiensis* linhagens 407, HD-1 e HD73.

	Núcleo	Exclusivo	Compartilhado
5S_rRNA	snR77	U12	GcvB
5_8S_rRNA	BsrC	U3	mir-6
tRNA	BsrF	U6	PrrB_RsmZ
RNaseP_bact_a	miR-430	let-7	ctRNA_pGA1
RNaseP_bact_b	rli40	ctRNA_pND324	sar
U3	AdoCbl riboswitch	snoZ165	U6atac
6S	rli61	sroD	NRON
Intron_gpl	rliD	IBV_D-RNA	MIR169_2
Intron_gpII	Plasmodium snoR31	mir-172	mir-302
Histone3	Bacillus-plasmid	MIR159	mir-202
FMN	SAM-I-IV-variant	mir-153	mir-308
TPP	crcB	MIR390	mir-454
yybP-ykoY	epsC	mir-147	MIR158
CsrC	pan	mir-451	mir-787
S15	yjdF	mir-81	MIR1122
IS128	cspA	mir-335	MIR530
SAM	MicX	mir-287	snR58
PrrB_RsmZ	RsaE	lisy-6	STnc490
Purine	tRNA Sec	mir-374	STnc250
Lysine	Bacteria large SRP	mir-259	NrrF
Bacteria_small_SRP	Archaea SRP	mir-233	rli45
Cobalamin	Phe leader	mir-423	rli48
SSU_rRNA_bacteria	SSU rRNA archaea	MIR529	Pedo-repair
T-box	SSU rRNA eukarya	mir-883	STnc50
glmS	group-II-D1D4-1	mir-876	STnc350
snoZ221 snoR21b	sraA	mir-434	MESTIT1_2
ydaO-yuaA	STnc40	MIR1444	XIST_A_REPEAT
ykoK	STnc370	mir-583	TtnuHACA18
Glycine	STnc320	STnc150	SpF22_sRNA
Thr leader	FsrA	S_pombe_snR42	ncr1175
Leu leader	TtnuCD19	greA	5_ureB_sRNA
His leader	SR1	rimP	mir-965
PyrR	SurA	RsaJ	
ylbH	sau-50	MIR2118	
PreQ1	sau-5971	mir-2807	
L13 leader	NsiR1	STnc230	
L19 leader	SpF25_sRNA	STnc540	
L10 leader	SpF43_sRNA	rivX	
L20 leader	ncr1015	GlsR16_miR3	
L21 leader	ncr1241	psRNA14	
SNORD69	ncr1575	PyrG_leader	
mir-14	Atu_C9	sau-19	
mir-299	ToxI	snoR125	

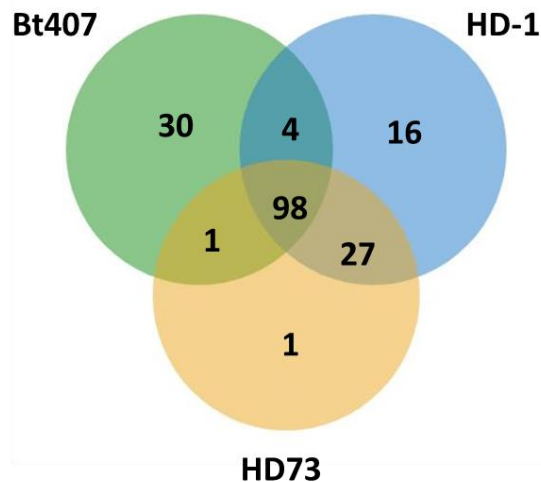
mir-556	LSU_rRNA_archaea	ohsC_RNA
mir-578	LSU_rRNA_bacteria	Spy1186876
Mir-533	SSU_rRNA_microsporidia	Spy392987
mir-1255	LSU_rRNA_eukarya	EF3314_EF3315
c-di-GMP-I	mt-tmRNA	
PK-G12rRNA	BSnc120	

Tabela 8. Número de famílias e de sequências de ncRNAs identificados em *B. thuringiensis* linhagens 407, HD-1 e HD73.

Linhagens	Número de sequências (Número de famílias)			TOTAL
	Núcleo	Exclusivo	Compartilhado	
<i>B. thuringiensis</i> 407	582 (98)	35 (30)	7 (5)	624 (133)
<i>B. thuringiensis</i> HD-1	600 (98)	20 (16)	36 (31)	656 (146)
<i>B. thuringiensis</i> HD73	563 (98)	1 (1)	30 (28)	594 (127)
TOTAL	1745 (98)	56 (47)	73 (32)	1874

*Classificação realizada segundo a presença nas três linhagens.

Figura 5. Representação do número de famílias de ncRNAs identificadas em *B. thuringiensis* linhagens 407, HD-1 e HD73.



A linhagem Bt407 foi a que apresentou a maior quantidade de ncRNAs exclusivos e a menor quantidade de RNAs compartilhados com outras linhagens (TABELA 8, FIGURAS 5 e 6). O maior número de ncRNAs compartilhados entre *B. thuringiensis* HD-1 e HD73 é decorrente do fato de essas duas linhagens pertencerem à subespécie *kurstaki*; enquanto a linhagem *B. thuringiensis* 407, pertence a uma outra subespécie (*thuringiensis*). Assim, as duas primeiras linhagens são filogeneticamente mais próximas entre si. No entanto, apesar da proximidade filogenética entre as linhagens HD-1 e HD73, houve grande variação entre a quantidade total de ncRNAs detectados nestas (TABELA 8). A linhagem HD-1

apresentou a maior quantidade total de ncRNAs, 656 contra 594 da linhagem HD73. Esses resultados demonstram que o número de ncRNAs pode variar mesmo entre linhagens filogeneticamente muito próximas, possivelmente devido à transferência horizontal de genes, comum entre as espécies do grupo *B. cereus* (BÖHM et al., 2015; MÉRIC et al., 2018).

Essa variação na quantidade de ncRNAs está diretamente relacionada ao tamanho do genoma. Na Tabela 9, é possível verificar que o número de famílias de ncRNA é diretamente proporcional ao tamanho do genoma para as três linhagens trabalhadas. Desta forma, na linhagem Bt407 foi identificado um total de 21,8 famílias de ncRNAs a cada 1 Mb de genoma, contra 21,79 famílias de ncRNAs em HD-1 e 21,5 famílias em HD73. A análise do tamanho do genoma das três linhagens demonstra que os plasmídeos representam diferentes proporções de tamanho de genoma. Assim, no caso das linhagens HD73 e Bt407, estes correspondem a ~4 e ~10% do genoma total (TABELA 9), respectivamente; porém, são responsáveis por quase 17% de todo o genoma da linhagem HD-1. Quando essa correlação é analisada levando-se em consideração os ncRNAs (TABELA 9), percebe-se que mesmo representando 17% do genoma em HD-1, os plasmídeos desta linhagem apresentaram praticamente a mesma quantidade de moléculas de ncRNAs que os plasmídeos de Bt407 (69 e 61, respectivamente), os quais correspondem a apenas 10% do genoma total e praticamente a metade do tamanho (0,6 Mb) dos plasmídeos de HD-1 (1,1 Mb).

Porém, esta correlação não é observada quando os plasmídeos de HD73 são analisados, uma vez que houve queda significativa na quantidade de moléculas de ncRNAs (19), isso possivelmente está relacionado ao tamanho reduzido do replicon (0,2 Mb).

Por sua vez, o tamanho do cromossomo parece não influenciar na quantidade de moléculas de ncRNAs. A única variação identificada no número de famílias foi encontrada também nos plasmídeos da linhagem HD73, onde mais uma vez, a diminuição no número de famílias parece relacionar-se com a redução no tamanho do replicon.

Tabela 9. Características gerais dos ncRNAs identificados nos genomas das linhagens Bt407, HD-1 e HD73 de *B. thuringiensis*.

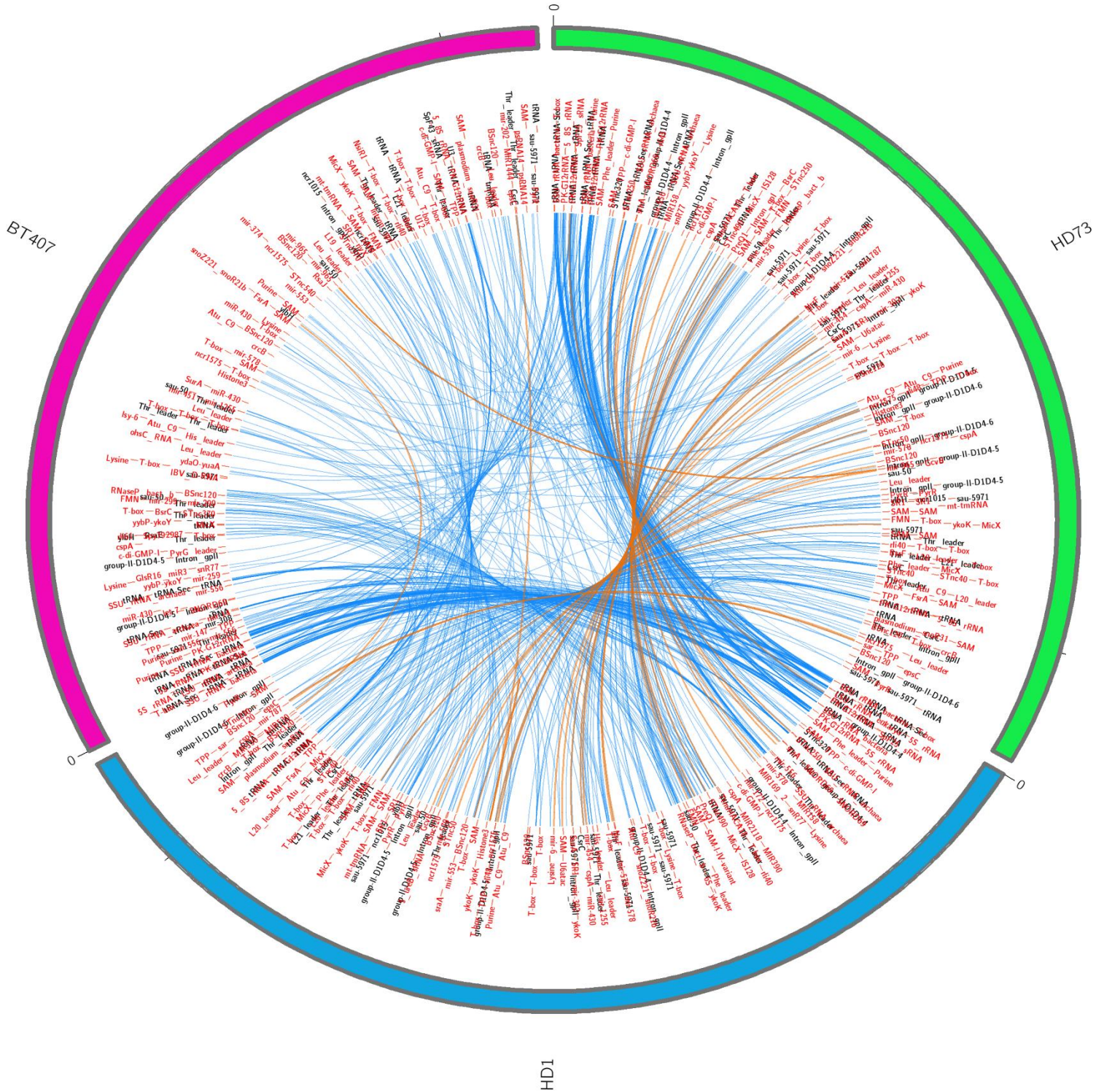
Linhagens	Tamanho replicon (Mb) / Número de famílias de ncRNA / Número de sequências de ncRNA			Razão Plasmídeo/Genoma (%)	
	Genoma	Cromossomo	Plasmídeos	Tamanho	Sequências de ncRNA
<i>B. thuringiensis</i> 407	6,1 / 133 / 624	5,5 / 117 / 563	0,6 / 16 / 61	10,3	9,8
<i>B. thuringiensis</i> HD-1	6,7 / 146 / 656	5,6 / 123 / 587	1,1 / 23 / 69	16,8	10,5
<i>B. thuringiensis</i> HD73	5,9 / 127 / 594	5,6 / 120 / 575	0,2 / 7 / 19	4,4	3,2

As Figuras 6 e 7 evidenciam uma forte correlação linear entre a localização dos ncRNAs das linhagens HD-1 e HD73 destacada pelo fato das linhas que correlacionam as famílias de ncRNAs serem paralelas e não se sobreporem. Este fato é observado principalmente na região que compreende as famílias SSU_rRNA_bacteria à PK-G12rRNA, localizadas no início dos cromossomos das linhagens HD73 e HD-1. Essa mesma relação de localização entre famílias de ncRNAs ocorre entre as linhagens HD-1 e Bt407, porém de maneira menos conservada.

Quando os ncRNAs são analisadas levando em consideração somente os plasmídeos (FIGURA 8), é possível notar que apenas a família MIR1122, considerada como compartilhada, está presente exclusivamente neste replicon. Na maioria dos plasmídeos foi possível a identificação de ao menos um ncRNA. No entanto, alguns não apresentaram nenhum ncRNA, independentemente dos seus tamanhos. Foi o que se observou no pequeno plasmídeo pBMB8513 da linhagem HD-1, com 8.513 pb e do grande plasmídeo pHT77, da linhagem HD73, com 76.490 pb. Dentre os plasmídeos que apresentaram algum tipo de elemento de transposição (FIGURA 1), apenas o pBMB14 e pBMB65 da linhagem HD-1, e o plasmídeo pHT77 da linhagem HD73 não apresentaram nenhuma família de ncRNAs (FIGURA 8). Todos os plasmídeos que apresentaram genes *cry* também exibiram ncRNAs. Desta forma, os resultados aqui apresentados demonstram que, entre os plasmídeos, não existe uma relação estrita quanto a tamanho e a presença de ncRNA, nem quanto à presença de outros elementos genéticos, como elementos de transposição, genes *cry* e a presença de ncRNAs.

linhas azuis representam os ncRNAs Núcleo, e as linhas laranjas representam os ncRNAs Compartilhados.

Figura 7. Visualização circular dos cromossomos de *B. thuringiensis* analisados, e a localização de seus respectivos ncRNAs identificados.



Do exterior para o interior, os dados representam: **Trilha 1:** Extensão do cromossomo de *B. thuringiensis* 407, HD-1 e HD73. O algoritmo 0 representa a origem de replicação de cada replicon; **Trilha 2:** Localização das famílias de ncRNAs identificadas em cada cromossomo. Em vermelho, estão identificadas as famílias consideradas como exclusivas de cromossomos; **Trilha 3:** Correlação entre os ncRNAs identificados em cada linhagem. As linhas azuis representam os ncRNAs Núcleo, e as linhas laranjas representam os ncRNAs Compartilhados entre as linhagens.

3.4.3 Caracterização do ncRNA selecionado

O ncRNA epsC selecionado para a etapa de validação de expressão, foi inicialmente caracterizado quanto sua estrutura e possíveis alvos. Após a sua análise pelo programa TargetRNA2, alguns dos possíveis alvos preditos foram selecionados a partir de uma cura manual dos dados baseada nas funções das proteínas codificadas pelos RNAm alvos (TABELA 10).

Todos os possíveis alvos obtidos nas análises, bem como suas características podem ser visualizados nos ANEXOS 2 e 3.

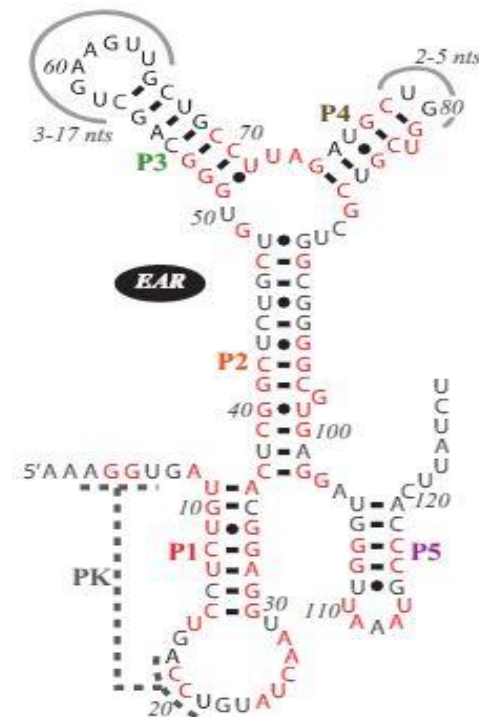
Tabela 10. ncRNA selecionado e alguns de seus respectivos alvos preditos.

ncRNA	RNAm alvo	Energia de Hibridação	Função
epsC	YacO	-16.14	Metiltransferase
	uBIE4	-15.28	Metiltransferase
	FtsY	-14.26	GTPase

Este ncRNA foi identificado neste trabalho como estando presente nas três linhagens avaliadas. Essa molécula pertence ao grupo EAR (**eps-Associated RNA**); tendo ação cis e sendo caracterizada como de grande importância para bactérias da ordem Bacillales. Sua estrutura secundária possui arquitetura conservada e consiste em cinco segmentos helicoidais (grampos) (P1-P5) e um *pseudoknot* (PK) (FIGURA 9). Seu papel funcional foi descrito em *B. subtilis* estando associado a genes de biossíntese de exopolissacarídeos; atuando na formação de biofilmes, síntese de cápsulas e esporulação (LEOFF et al., 2008; IRNOV; WINKLER, 2010; WEINBERG et al., 2010).

A transcrição do *operon eps* é controlada por várias vias de sinalização coordenadas (CHU et al., 2008; CHAI et al., 2009; WINKELMAN; BLAIR; KEARNS, 2009) e o ncRNA epsC é responsável por uma etapa adicional de controle genético co-transcricional desse *operon* através de um mecanismo de anti-terminação processual, garantindo a sua síntese completa. Na ausência deste mecanismo, a transcrição do *operon eps* é truncada em pontos intermediários, resultando em um fenótipo deficiente de exopolissacarídeos (IRNOV; WINKLER, 2010).

Figura 9. Estrutura secundária do ncRNA epsC.



FONTE: IRNOV; WINKLER, 2010.

O estudo de IRNOV e WINKLER (2010) avaliou bactérias da ordem Bacillales e demonstrou que, de acordo com a espécie, o elemento EAR pode localizar-se entre diferentes arranjos gênicos. Mesmo com essas variações, foi sempre identificado em uma região intergênica de um *operon* de polissacarídeos ou de biofilme, a montante de genes de biossíntese e a jusante de alguns genes reguladores.

No caso das linhagens de *B. subtilis* analisadas, o ncRNA foi identificado dentro do *operon eps*, mais precisamente entre a segunda e terceira ORFs, que compreendem os genes *epsB* e *epsC*, respectivamente. O que não aconteceu com a linhagem *B. cereus* ATCC10987, onde o ncRNA foi localizado entre genes responsáveis pela biossíntese de polissacarídeos capsulares, fosforilases, ATPases, epimerases e outros, sempre relacionados à alguma forma de regulação ou biossíntese, sugerindo um mecanismo parecido de regulação. Ademais, a sequência do ncRNA mostrou grande conservação entre as espécies de *Bacillus*, bem como quando comparada a outros gêneros adicionais da ordem Bacillales, dentre estes *Anoxybacillus*, *Geobacillus* e *Paenibacillus*.

Nas três linhagens de *B. thuringiensis* estudadas neste trabalho esse ncRNA foi identificado em uma região que compreende diversos genes codificadores de polissacarídeos capsulares e responsáveis pela formação de biofilme; bem como quinases, fosfatases e transferases, além do gene *epsD* na linhagem Bt407 (FIGURA 10).

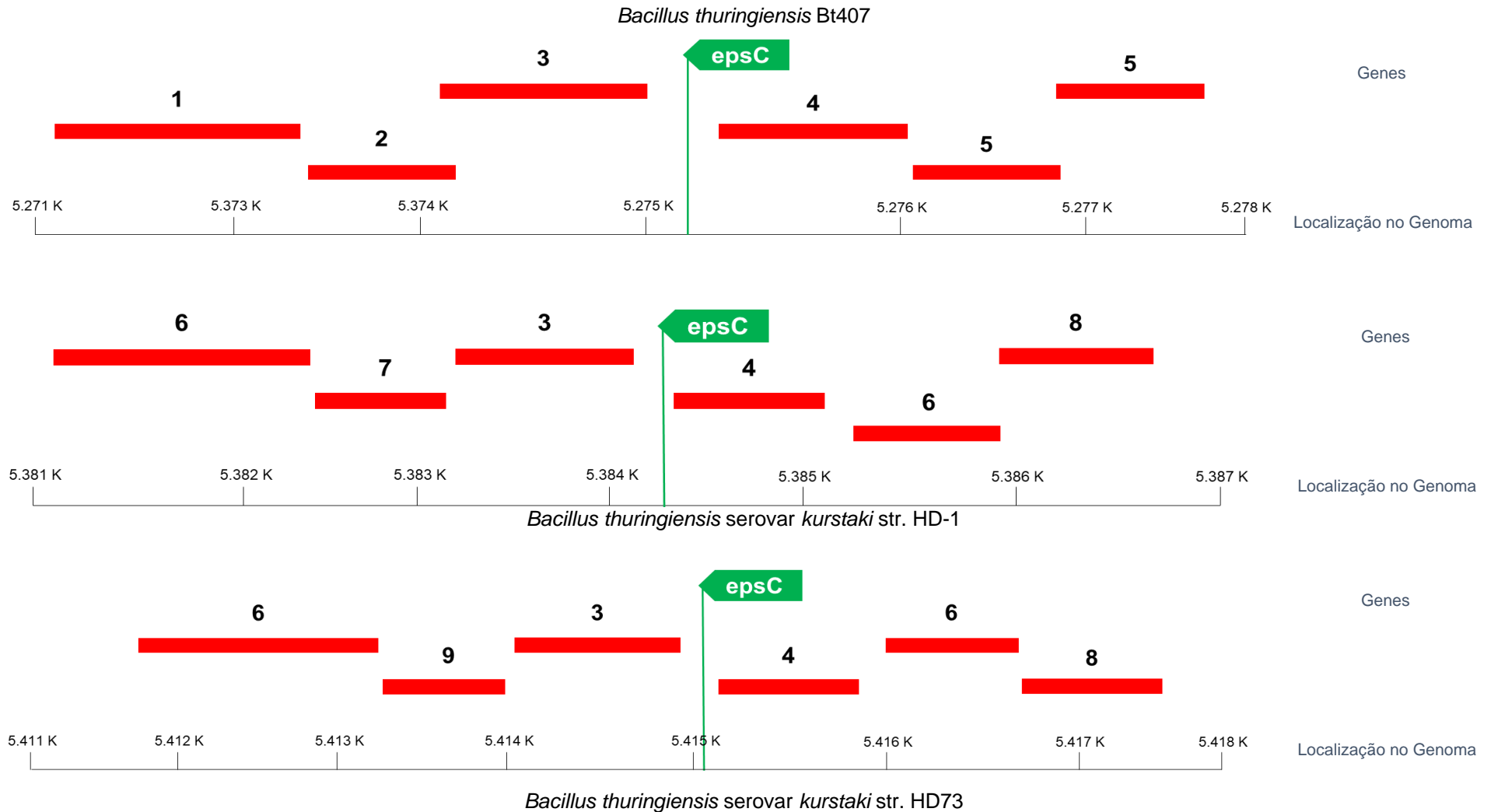
Com auxílio da ferramenta Blast, foi possível identificar que a sequência de ncRNA obtida nas linhagens de *Bt* está situada exatamente na mesma região detectada por IRNOV e WINKLER (2010) tanto em *B. subtilis* (*operon eps*) quanto na linhagem *B. cereus* ATCC10987 (FIGURA 11). Desta forma, as sequências do ncRNA confirmaram o alto nível de conservação dos nucleotídeos, corroborando com os resultados acima, permitindo inferir ao ncRNA o mesmo papel funcional comprovado em *B. subtilis*.

O ncRNA *epsC* teve seus alvos preditos para as linhagens Bt407 e HD73, uma vez que o banco de dados do programa TargetRNA2 ainda não possui depositada as sequências do genoma de HD-1. Dentre os possíveis alvos, identificamos o gene *ftsY* (Bt407) e o locus HD73_4130 (HD73) que, segundo o NCBI codificam uma partícula de sinal de reconhecimento à proteína FtsY.

A proteína FtsY (Srb) de *B. subtilis* é homóloga à subunidade α do receptor para partículas de reconhecimento de sinal de mamíferos (SRP). Esta é essencial para a secreção de proteínas e desenvolvimento de células vegetativas já tendo sido relacionada à fase de esporulação (KAKESHITA et al., 2000; RUBIO; JIANG; POGLIANO, 2005), confirmando a possibilidade do RNAm FtsY ser alvo do ncRNA *epsC*.

É perceptível uma grande quantidade de possíveis alvos identificados para *epsC*, sendo 112 e 105 nas linhagens Bt407 e HD73, respectivamente (ANEXOS 2 e 3). O estudo de IRNOV; WINKLER (2010) demonstrou que o loop L1 do grampo P1 (FIGURA 9) pode ser necessário para um papel funcional que vai além da formação da estrutura secundária deste ncRNA; como por exemplo, o auxílio de interações intermoleculares com outros componentes celulares, possibilitando ligação à numerosas moléculas, explicando a grande quantidade de possíveis alvos.

Figura 10. Representação gráfica da localização do ncRNA epsC nas linhagens de *B. thuringiensis* Bt407, HD-1 e HD73.

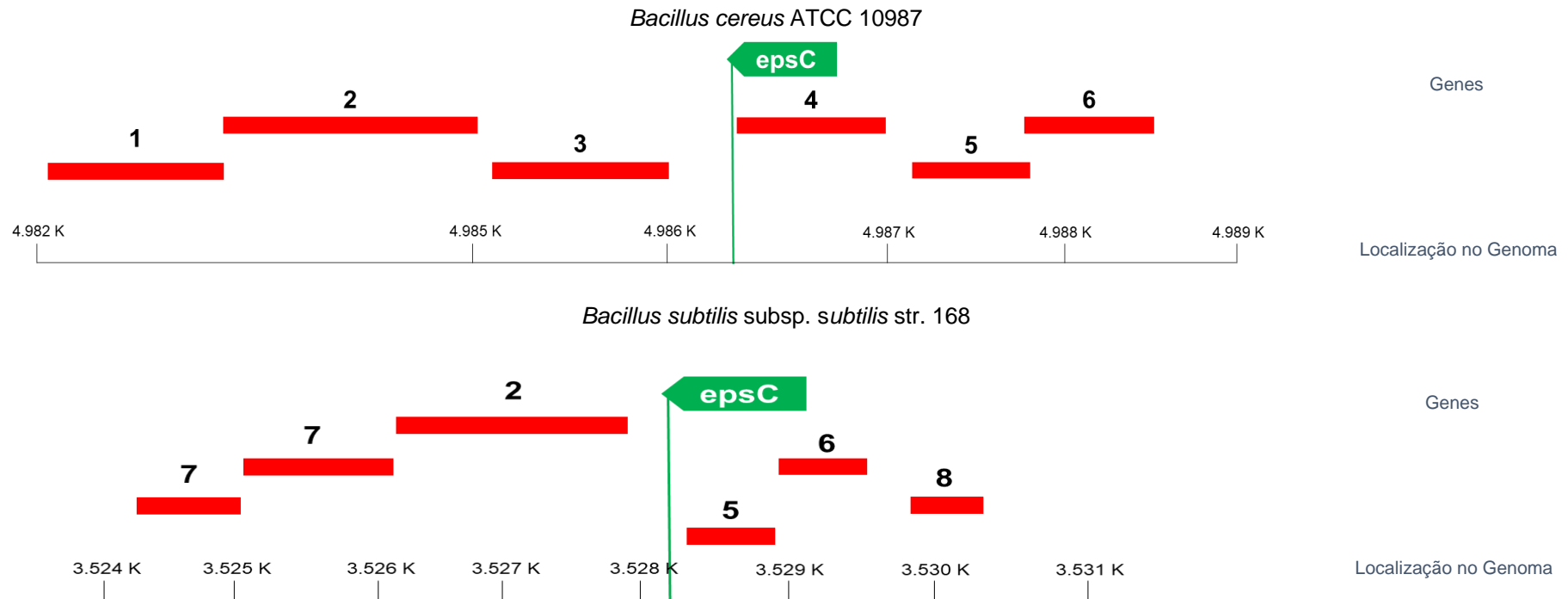


*Em verde está em evidência a localização do ncRNA epsC identificado neste trabalho. Os números indicados em cada ORF correspondem à funcionalidade da proteína expressa pelo gene, indicada abaixo. Anotação manual realizada com auxílio da base de dados UniProt.

- | | | | |
|---|------------------|---|-----------------------------------|
| 1 | Desidrogenase | 6 | Biossíntese de polissacarídeos |
| 2 | Fosfotransferase | 7 | Biossíntese de exopolissacarídeos |

- | | |
|----------------------------|--|
| 3 Uridiltransferase | 8 Biosíntese de lipopolissacarídeos |
| 4 Fosfatase | 9 Transferase |
| 5 Quinase | |

Figura 11. Representação da localização do ncRNA epsC identificado neste trabalho nas linhagens de *B. cereus* e *B. subtilis* avaliadas por IRNOV; WINKLER (2010).



* Em verde está em evidência a localização do ncRNA epsC identificado neste trabalho. Os números indicados em cada ORF correspondem à funcionalidade da proteína expressa pelo gene, indicada abaixo. Anotação manual realizada com auxílio da base de dados UniProt.

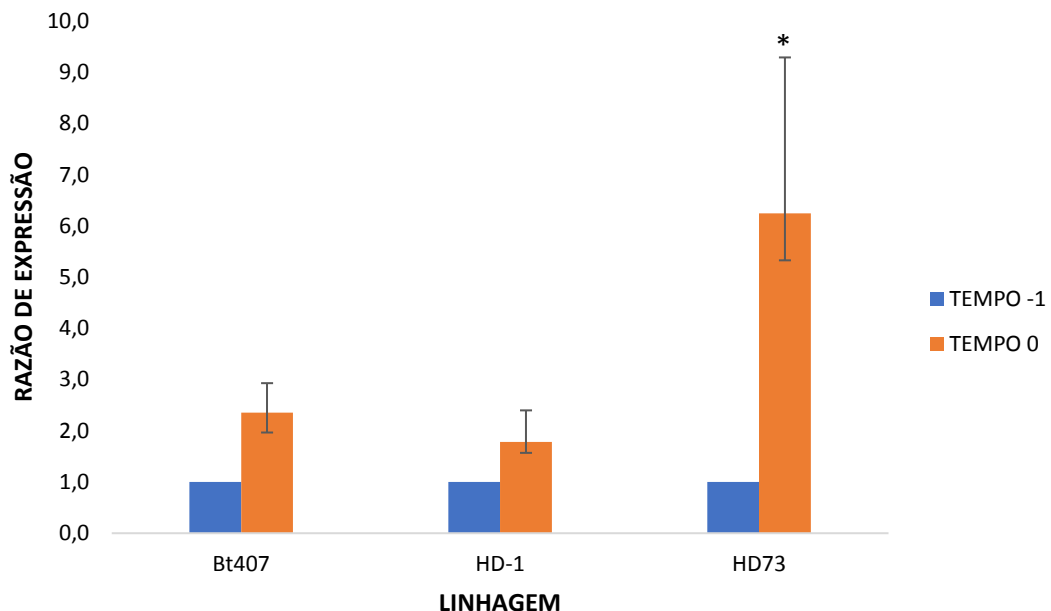
- | | | | |
|---|--------------------------------|---|------------------------------------|
| 1 | Aminotransferase | 5 | Quinase |
| 2 | Biossíntese de polissacarídeos | 6 | Biossíntese de lipopolissacarídeos |
| 3 | Uridiltransferase | 7 | Transferase |
| 4 | Fosfatase | 8 | Regulação transcricional |

3.4.4 Análises de expressão

As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio LB até a entrada em fase estacionária onde ocorrem grandes modificações fisiológicas nas células bacterianas devido a um acúmulo de inibidores de metabolismo e esgotamento de nutrientes essenciais, levando ao início do processo de esporulação (PERCHAT et al., 2011). Segundo PERCHAT e colaboradores (2011), uma linhagem de *Bacillus* atinge o início de fase estacionária (T0) quando alcança 1×10^8 UFC/mL. Sendo assim, a expressão do gene foi avaliada em T0 e também em T-1 definido como o tempo de uma hora antes da entrada em fase estacionária, afim de comparar o final da fase de crescimento exponencial bacteriano (log) e a entrada em fase estacionária.

O gene que codifica o ncRNA epsC apresentou expressão em ambos os tempos e nas três linhagens avaliadas (FIGURA 10). Sua expressão não apresentou alteração significativa nas linhagens Bt407 e HD-1, porém mostrou aumento significativo no tempo T0 na linhagem HD73 (FIGURA 12).

Figura 12. Expressão relativa do ncRNA epsC identificado nos genomas das linhagens Bt407, HD-1 e HD73 de *B. thuringiensis*.



“*” representa variação estatística significativa.

O ncRNA epsC já foi identificado atuando na esporulação bacteriana (LEOFF et al., 2008; IRNOV; WINKLER, 2010; WEINBERG et al., 2010). O aumento

na expressão deste ncRNA está atrelado ao fato de que células vegetativas de bactérias que formam endósporos iniciam a esporulação quando um nutriente essencial se torna escasso ou indisponível, o que ocorre no início da fase estacionária (PLETNEV et al., 2015; SINAI et al., 2015).

Os diferentes padrões de expressão desse gene nas linhagens de *B. thuringiensis* pode ser explicado devido a variações no *background* genético entre as linhagens avaliadas. Dessa forma, linhagens diferentes, mesmo que geneticamente similares, podem utilizar rotas diferentes para se adaptar às mesmas alterações ambientais. Essa diversidade de respostas pode permitir a uma população bacteriana complexa, formada por diferentes linhagens de uma mesma espécie, maiores chances de sobrevivência e adaptação.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho, o primeiro a realizar a busca e análise de ncRNAs em linhagens de *B. thuringiensis*, possibilitou identificar, caracterizar e validar um ncRNA em três linhagens de *Bt*. Os resultados demonstraram que as três linhagens avaliadas apresentaram perfis diferentes de composição de ncRNAs com variações quanto à quantidade de famílias e de sequências, bem como, variações em pares de base no nível de sequências pertencentes às mesmas famílias. Ademais, as linhagens exibiram um padrão diferente de expressão do ncRNA *epsC* demonstrando que, mesmo quando apresentam elementos genéticos coincidentes, diferentes linhagens podem diferenciar-se quanto à expressão dessas moléculas. Tal diferença em nível de expressão evidencia que mesmo bactérias geneticamente muito similares podem apresentar diferentes respostas frente às modificações ambientais.

Assim, considerando que muitos dos ncRNAs identificados estão envolvidos em processos regulatórios complexos, inclusive aqueles relacionados à virulência, patogenicidade, resistência e sobrevivência desta espécie, a caracterização de ncRNAs a partir do genoma de *B. thuringiensis* pode fornecer uma contribuição importante para uma maior compreensão da biologia desta bactéria e de outras espécies relacionadas. Além disso, os resultados desse estudo podem também auxiliar na identificação de ncRNAs em outros microrganismos, uma vez que exemplos presentes na literatura são essenciais para o aprimoramento de estudos nesta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONS, S.; ABBAS, A.; ADAMS, C.; FENTON, A.; O'GARA, F. A Regulatory RNA (PrrB RNA) Modulates Expression of Secondary Metabolite Genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 14, p. 3913-3919, 2000.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 215-237, 2003.
- ARNÉR, E. S. Selective Evaluation of Thioredoxin Reductase Enzymatic Activities. In: **Selenoproteins**. Humana Press, New York, NY, p. 301-309, 2018.
- BACKOFEN, R.; ENGELHARDT, J.; ERXLEBEN, A.; FALLMANN, J.; GRÜNING, B.; OHLER, U.; RAJEWSKY, N.; STADLER, P. F. RNA-bioinformatics: tools, services and databases for the analysis of RNA-based regulation. **Journal of biotechnology**, v. 261, p. 76-84, 2017.
- BERNHART, S. H.; HOFACKER, I. L.; STADLER, P. F. Local RNA base pairing probabilities in large sequences. **Bioinformatics**, v. 22, n. 5, p. 614-615, 2005.
- BERNHART, S. H.; HOFACKER, I. L. From consensus structure prediction to RNA gene finding. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 461-471, 2009.
- BERNISH, B.; VAN DE RIJN, I. Characterization of a two-component system in *Streptococcus pyogenes* which is involved in regulation of hyaluronic acid production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4786-4793, 1999.
- BOHN, C.; RIGOULAY, C.; CHABELSKAYA, S.; SHARMA, C. M.; MARCHAIS, A.; SKORSKI, P.; BOREZÉE-DURANT, E.; BARBET, R.; JACQUET, E.; GAUTHERET, A. J. D.; FELDEN, B.; VOGEL, J.; GAUTHERET, D. Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 19, p. 6620-6636, 2010.
- BÖHM, M. E.; HUPTAS, C.; KREY, V. M.; SCHERER, S. Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. **BMC evolutionary biology**, v. 15, n. 1, p. 246, 2015.
- BREAKER, R. R. RNA switches out in the cold. **Molecular cell**, v. 37, n. 1, p. 1-2, 2010.
- BROSNAN, C. A.; VOINNET, O. The long and the short of noncoding RNAs. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 3, p. 416-425, 2009.
- CHAI, Y.; KOLTER, R.; LOSICK, R. Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 74, n. 4, p. 876-887, 2009.

CHEONG, W. H. ; TAN, Y. C.; YAP, S. J.; NG, K. P. ClicO FS: an interactive web-based service of Circos. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3685-3687, 2015.

CHU, F.; KEARNS, D. B.; MCLOON, A.; CHAI, Y.; KOLTER, R.; LOSICK, R. A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1117-1127, 2008.

CHURCHWARD, G. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. **Molecular microbiology**, v. 64, n. 1, p. 34-41, 2007.

DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. **Molecular microbiology**, v. 65, n. 2, p. 373-385, 2007.

DECLERCK, N; BOUILLAUT, L.; CHAIX, D.; RUGANI, N.; SLAMTI, L.; HOH, F.; LERECLUS, D.; AROLD, S. T. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 47, p. 18490-18495, 2007.

DURAND, S.; BRAUN, F.; LIOLIOU, E.; ROMILLY, C.; HELFER, A. C.; KUHN, L.; QUITTOT, N.; NICOLAS, P.; ROMBY, P.; CONDON, C. A nitric oxide regulated small RNA controls expression of genes involved in redox homeostasis in *Bacillus subtilis*. **PLoS genetics**, v. 11, n. 2, p. e1004957, 2015.

EDDY, S. R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 12, p. 919-929, 2001.

FEDERLE, M. J.; MCIVER, K. S.; SCOTT, J. R. A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *Streptococcus*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 12, p. 3649-3657, 1999.

FOZO, E. M.; KAWANO, M.; FONTAINE, F.; KAYA, Y.; MENDIETA, K. S.; JONES, K. L.; OCAMPO, A.; RUDD, K. E.; STORZ, G. Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. **Molecular microbiology**, v. 70, n. 5, p. 1076-1093, 2008.

FOZO, E. M.; MAKAROVA, K. S.; SHABALINA, S. A.; YUTIN, N.; KOONIN, E. V.; STORZ, G. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 11, p. 3743-3759, 2010.

FOZO, E. M. New type I toxin-antitoxin families from "wild" and laboratory strains of *E. coli*: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz. **RNA biology**, v. 9, n. 12, p. 1504-1512, 2012.

GABALLA, A.; ANTELMANN, H.; Aguilar, C.; KHAKH, S. K.; SONG, K. B.; SMALDONE, G. T.; HELMANN, J. D. The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11927-11932, 2008.

GEISSMANN, T.; CHEVALIER, C.; CROS, M. J.; BOISSET, S.; FECHTER, P.; NOIROT, C.; SCHRENZEL, J.; FRANÇOIS, P.; VANDENESCH, F.; GASPIN, C.; ROMBY, P. A search for small noncoding RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a conserved sequence motif for regulation. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 21, p. 7239-7257, 2009.

GIULIODORI, A. M.; DI PIETRO, F.; MARZI, S.; MASQUIDA, B.; WAGNER, R.; ROMBY, P.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. **Molecular cell**, v. 37, n. 1, p. 21-33, 2010.

GOMES, A. Q.; REAL, C.; ANTUNES, F.; MARINHO, H. S.; NOLASCO, S.; SOARES, H. Noncoding RNAs as critical players in regulatory accuracy, redox signaling, and immune cell functions. **Current developments in biotechnology and bioengineering**, p. 215-284, 2017.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95, 2004.

HEATH, A.; DIRITA, V. J.; BARG, N. L.; ENGLEBERG, N. C. A Two-Component Regulatory System, CsrR-CsrS, Represses Expression of Three *Streptococcus pyogenes* Virulence Factors, Hyaluronic Acid Capsule, Streptolysin S, and Pyrogenic Exotoxin B. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5298-5305, 1999.

HEEB, S.; HAAS, D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 14, n. 12, p. 1351-1363, 2001.

IRNOV, I.; SHARMA, C. M.; VOGEL, J.; WINKLER, W. C. Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 19, p. 6637-6651, 2010.

IRNOV, I.; WINKLER, W. C. A regulatory RNA required for antitermination of biofilm and capsular polysaccharide operons in Bacillales. **Molecular microbiology**, v. 76, n. 3, p. 559-575, 2010.

JACKSON, D. W.; SUZUKI, K.; OAKFORD, L.; SIMECKA, J. W.; HART, M. E.; ROMEO, T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 290-301, 2002.

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; MERESHUK, Y.; MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W5-W9, 2008.

KAKESHITA, H.; OGURO, A.; AMIKURA, R.; NAKAMURA, K.; YAMANE, K. Expression of the *ftsY* gene, encoding a homologue of the α subunit of mammalian signal recognition particle receptor, is controlled by different promoters in vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2595-2603, 2000.

KALVARI, I.; ARGASINSKA, J.; QUINONES-OLVERA, N.; NAWROCKI, E. P.; RIVAS, E.; EDDY, S. R.; ... PETROV, A. I. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D335-D342, 2017.

KAWANO, M.; REYNOLDS, A. A.; MIRANDA-RIOS, J.; STORZ, G. Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 3, p. 1040-1050, 2005.

KERY, M. B.; FELDMAN, M.; LIVNY, J.; TJADEN, B. TargetRNA2: Identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 124-129, 2014.

KIHLBERG, B. M.; COONEY, J.; CAPARON, M. G.; OLSÉN, A.; BJÖRCK, L. Biological properties of a *Streptococcus pyogenes* mutant generated by Tn916 insertion in *mga*. **Microbial pathogenesis**, v. 19, n. 5, p. 299-315, 1996.

KIM, K.; MEYER, R. J. Copy-number of broad host-range plasmid R1162 is regulated by a small RNA. **Nucleic acids research**, v. 14, n. 20, p. 8027-8046, 1986.

KO, K. S.; KUWAHARA, T.; HAEHWA, L.; YOON, Y. J.; KIM, B. J.; LEE, K. H.; OHNISHI, Y.; KOOK, Y. H. RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequence analysis for the identification of *Bacteroides* spp. **Clinical microbiology and infection**, v. 13, n. 1, p. 48-54, 2007.

KRZYWINSKI, M.; SCHEIN, J.; BIROL, I.; CONNORS, J.; GASCOYNE, R.; HORSMAN, D.; JONES, S. J.; MARRA, M. A. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. **Genome research**, v. 19, n. 9, p. 1639-1645, 2009.

LAGANÀ, A.; FERRO, A.; CROCE, C. M. Editorial: Bioinformatics of non-coding RNAs with applications to biomedicine: recent advances and open challenges. **Bioinformatics of Non-Coding RNAs with Applications to Biomedicine: Recent Advances and Open Challenges**, p. 4, 2017.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; ... THOMPSON, J. D. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEOFF, C.; SAILE, E.; SUE, D.; WILKINS, P.; QUINN, C. P.; CARLSON, R. W.; KANNENBERG, E. L. Cell wall carbohydrate compositions of strains from the *Bacillus cereus* group of species correlate with phylogenetic relatedness. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 112-121, 2008.

LEVIN, J. C.; WESSELS, M. R. Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 1, p. 209-219, 1998.

LI, W.; YING, X.; LU, Q.; CHEN, L. Predicting sRNAs and their targets in bacteria. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 10, n. 5, p. 276-284, 2012.

LIU, M. Y.; GUI, G.; WEI, B.; PRESTON, J. F.; OAKFORD, L.; YÜKSEL, Ü.; GIDROC, G. P.; ROMEO, T. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17502-17510, 1997.

LLUCH-SENAR, M.; DELGADO, J.; CHEN, W. H.; LLORENS-RICO, V.; O'REILLY, F. J.; WODKE, J. A.; ... SERRANO, L. Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium. **Molecular systems biology**, v. 11, n. 1, p. 780, 2015.

LORENZ, R.; BERNHART, S. H.; ZU SIEDERDISSEN, C. H.; TAFER, H.; FLAMM, C.; STADLER, P. F.; HOFACKER, I. L. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 26, 2011.

LUKOMSKI, S.; NAKASHIMA, K.; ABDI, I.; CIPRIANO, V. J.; SHELVIN, B. J.; GRAVISS, E. A.; MUSSER, J. M. Identification and Characterization of a Second Extracellular Collagen-Like Protein Made by Group A *Streptococcus*: Control of Production at the Level of Translation. **Infection and immunity**, v. 69, n. 3, p. 1729-1738, 2001.

MACHADO-LIMA, A.; DEL PORTILLO, H. A.; DURHAM, A. M. Computational methods in noncoding RNA research. **Journal of mathematical biology**, v. 56, n. 1-2, p. 15-49, 2008.

MELLIN, J. R.; GOSWAMI, S.; GROGAN, S.; TJADEN, B.; GENCO, C. A. A novel fur-and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 10, p. 3686-3694, 2007.

MENG, Q.; SWITZER, R. L. cis-acting sequences of *Bacillus subtilis* *pyrG* mRNA essential for regulation by antitermination. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6734-6738, 2002.

MÉRIC, G.; MAGEIROS, L.; PASCOE, B.; WOODCOCK, D. J.; MOURKAS, E.; LAMBLE, S.; BOWDEN, R.; JOLLEY, K. A.; RAYMOND, B.; SHEPPARD, S. K. Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. **Molecular ecology**, v. 27, p. 1524-1540, 2018.

MILLER, J. H.; AVILES-REYES, A.; SCOTT-ANNE, K.; GREGOIRE, S.; WATSON, G. E.; SAMPSON, E.; PROGULSKE-FOXE, A.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; LEMOS, A. J.; ABRANCHES, J. The collagen binding protein Cnm contributes to oral colonization and cariogenicity of *Streptococcus mutans* OMZ175. **Infection and immunity**, v. 83, n. 5, p. 2001-2010, 2015.

NAWROCKI, E. P.; KOLBE, D. L.; EDDY, S. R. Infernal 1.0: Inference of RNA alignments. **Bioinformatics**, v. 25, n. 10, p. 1335–1337, 2009.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. **Infernal user's guide**, 2016.

OKADA, N.; GEIST, R. T.; CAPARON, M. G. Positive transcriptional control of *mry* regulates virulence in the group A streptococcus. **Molecular microbiology**, v. 7, n. 6, p. 893-903, 1993.

PANNEKOEK, Y.; HUIS IN'T VELD, R.; SCHIPPER, K.; BOVENKERK, S.; KRAMER, G.; SPEIJER, D.; VAN DER ENDE, A. Regulation of *Neisseria meningitidis* cytochrome *bc1* components by NrrF, a Fur controlled small non-coding RNA. **FEBS open bio**, 2017.

PERCHAT, S.; DUBOIS, T.; ZOUHIR, S.; GOMINET, M.; PONCET, S.; LEMY, C.; LERECLUS, D. A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Molecular microbiology**, v. 82, n. 3, p. 619-633, 2011.

PLETNEV, P.; OSTERMAN, I.; SERGIEV, P.; BOGDANOV, A.; DONTSOVA, O. Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase. **Acta Naturae (англоязычная версия)**, v. 7, n. 4 (27), 2015.

QI, Y.; PATRA, G.; LIANG, X.; WILLIAMS, L. E.; ROSE, S.; REDKAR, R. J.; DELVECCHIO, V. G. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3720-3727, 2001.

RASMUSSEN, S.; NIELSEN, H. B.; JARMER, H. The transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1043-1057, 2009.

ROBERTS, S. A.; SCOTT, J. R. RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1506-1522, 2007.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 1-52, 2013.

RUBIO, A.; JIANG, X.; POGLIANO, K. Localization of translocation complex components in *Bacillus subtilis*: enrichment of the signal recognition particle receptor at early sporulation septa. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 5000-5002, 2005.

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

SANAHUJA, G., BANAKAR, R., TWYMAN, R. M., CAPELL, T., CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 283-300, 2011.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for sustainable development**, 2010.

SIMPSON, W. J.; LAPENTA, D.; CHEN, C.; CLEARY, P. P. Coregulation of type 12 M protein and streptococcal C5a peptidase genes in group A streptococci: evidence for a virulence regulon controlled by the virR locus. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 696-700, 1990.

SINAI, L.; ROSENBERG, A.; SMITH, Y.; SEGEV, E.; BEN-YEHUDA, S. The molecular timeline of a reviving bacterial spore. **Molecular cell**, v. 57, n. 4, p. 695-707, 2015.

SLAMTI, L.; PERCHAT, S.; HUILLET, E.; LERECLUS, D. Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2239-2255, 2014.

SMALDONE, G. T.; ANTELMANN, H.; GABALLA, A.; HELMANN, J. D. The FsrA sRNA and FbpB protein mediate the iron-dependent induction of the *Bacillus subtilis* lutABC iron-sulfur-containing oxidases. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2586-2593, 2012.

SMITH, K. D.; LIPCHOCK, S. V.; STROBEL, S. A. Structural and biochemical characterization of linear dinucleotide analogues bound to the c-di-GMP-I aptamer. **Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 425-432, 2011.

SONNLEITNER, E.; ROMEO, A.; BLÄSI, U. Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. **RNA biology**, v. 9, n. 4, p. 364-371, 2012.

TANG, Q.; YIN, K.; QIAN, H.; ZHAO, Y.; WANG, W.; CHOU, S. H.; FU, Y.; HE, J. Cyclic di-GMP contributes to adaptation and virulence of *Bacillus thuringiensis* through a riboswitch-regulated collagen adhesion protein. **Scientific reports**, v. 6, p. 28807, 2016.

TERAO, Y.; KAWABATA, S.; KUNITOMO, E.; MURAKAMI, J.; NAKAGAWA, I.; HAMADA, S. Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the fba gene is positively transcribed under the Mga regulator. **Molecular microbiology**, v. 42, n. 1, p. 75-86, 2001.

TURNBOUGH, C. L.; SWITZER, R. L. Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 266-300, 2008.

ULVÉ, V. M.; SEVIN, E. W.; CHÉRON, A.; BARLOY-HUBLER, F. Identification of chromosomal alpha-proteobacterial small RNAs by comparative genome analysis and detection in *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 467, 2007.

VALENTINI, M.; FILLoux, A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 24, p. 12547-12555, 2016.

VENGADESAN, K.; NARAYANA, S. V. L. Structural biology of gram-positive bacterial adhesins. **Protein Science**, v. 20, n. 5, p. 759-772, 2011.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 58, p. 611-647, 2004.

WATERS, L. S.; STORZ, G. Regulatory RNAs in bacteria. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 615-628, 2009.

WEINBERG, Z.; WANG, J. X.; BOGUE, J.; YANG, J.; CORBINO, K.; MOY, R. H.; BREAKER, R. R. Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. **Genome biology**, v. 11, n. 3, p. R31, 2010.

WINKELMAN, J. T.; BLAIR, K. M.; KEARNS, D. B. RemA (YlzA) and RemB (YaaB) regulate extracellular matrix operon expression and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 12, p. 3981-3991, 2009.

XU, Y.; LIANG, X.; CHEN, Y.; KOEHLER, T. M.; HÖÖK, M. Identification and biochemical characterization of two novel collagen binding MSCRAMMs of *Bacillus anthracis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51760-51768, 2004.

ZHENG, L.; QU, L. Computational RNomics: Structure identification and functional prediction of non-coding RNAs *in silico*. **Science China Life Sciences**, v. 53, n. 5, p. 548-562, 2010.

ANEXO 1. Resultados detalhados dos ncRNAs significativos identificados nas análises dos três genomas.

ncRNA	Quantidade Total	Bt407						HD-1						HD73					
		Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo		
		N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
5S_rRNA	39	14					13						12						
5_8S_rRNA	40	14					14						12						
tRNA	346	108			35		97				1		105						
U12	1			1															
RNaseP_bact_a	3	1					1						1						
RNaseP_bact_b	3	1					1						1						
U3	2			1					1										
6S	6	2					2						2						
Metazoa_SRP	3	1					1						1						
GcvB	2								1						1				
tmRNA	19	7			1		5						6						
U6	1											1							
let-7	1			1															
Intron_gpl	7	2					2						3						
Intron_gpll	57	3			1		13				21		15			4			
Histone3	5	1					2						2						
FMN	6	2					2						2						
TPP	22	8					7						7						
yypP-ykoY	6	2					2						2						
CsrC	13	2			1		5						5						
S15	3	1					1						1						
IS128	4	1					2						1						
mir-6	2								1						1				
SAM	50	18					16						16						
PrrB_RsmZ	2								1						1				
Purine	21	7					7						7						
Lysine	12	4					4						4						
Bacteria_small_SRP	3	1					1						1						
Cobalamin	3	1					1						1						
SSU_rRNA_bacteria	40	14					14						12						
T-box	136	45					45						46						

N: Região Núcleo

C: Região Compartilhada

E: Região Exclusiva

ncRNA	Quantidade Total	Bt407						HD-1						HD73					
		Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo		
		N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
glmS	3	1								1									
ctRNA_pGA1	2								1								1		
ctRNA_pND324	1									1									
sar	2									1							1		
snoZ221_snoR21b	4	2								1							1		
snoZ165	1	1																	
sroD	1	1																	
ydaO-yuaA	12	4								4							4		
ykoK	12	2								5							5		
IBV_D-RNA	1				1														
mir-172	1									1									
Glycine	3	1								1							1		
Thr_leader	44	13								16			1				14		
Leu_leader	17	6								5							6		
His_leader	3	1								1							1		
PyrR	12	4								4							4		
ylbH	8	3								2			1				2		
PreQ1	6	2								2							2		
L13_leader	3	1								1							1		
L19_leader	3	1								1							1		
L10_leader	3	1								1							1		
L20_leader	8	2								3							3		
L21_leader	4	1					1			1							1		
SNORD69	4	1								2							1		
U6atac	2										1							1	
NRON	2										1							1	
MIR159	1																		1
MIR169_2	2										1							1	
mir-153	2																		2
mir-302	2										1							1	
MIR390	2																		2

N: Região Núcleo

C: Região Compartilhada

E: Região Exclusiva

ncRNA	Quantidade Total	Bt407						HD-1						HD73					
		Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo		
		N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
mir-147	1			1															
mir-202	3		1						2										
mir-451	2			2															
mir-81	1									1									
mir-308	3		1											2					
mir-454	2								1						1				
mir-14	6	2						2							2				
mir-299	5	3						1							1				
mir-335	1			1															
mir-287	1													1					
lsy-6	1			1															
mir-374	2			2															
MIR158	2								1						1				
mir-259	1			1															
mir-233	1													1					
mir-423	1													1					
mir-787	4								1		1				2				
MIR1122	3					2							1						
MIR529	1						1												
mir-883	1													1					
mir-876	1													1					
mir-434	2									2									
MIR1444	1			1															
mir-556	13	6						3							4				
mir-578	9	1						5							3				
mir-583	1			1															
mir-553	6	2						2							2				
mir-1255	3	1						1							1				
MIR530	3		1						2										
c-di-GMP-I	8	4						2							2				
PK-G12rRNA	40	14						14							12				

N: Região Núcleo

C: Região Compartilhada

E: Região Exclusiva

ncRNA	Quantidade Total	Bt407						HD-1						HD73					
		Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo		
		N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
snR77	3	1							1							1			
snR58	2								1							1			
STnc150	1																		1
STnc490	2								1							1			
STnc250	4								2							2			
BsrC	6	2							2							2			
BsrF	3	1							1							1			
miR-430	5	3							1							1			
NrrF	2									1							1		
S_pombe_snR42	1				1														
rli40	6	2							2							2			
rli45	2									1							1		
rli48	2									1							1		
AdoCbl_riboswitch	3	1							1							1			
rli61	3	1							1							1			
rliD	3	1							1							1			
plasmodium_snoR31	3	1							1							1			
Bacillus-plasmid	9					4						3						2	
Pedo-repair	2									1							1		
SAM-I-IV-variant	3	1							1							1			
crcB	4	2							1							1			
epsC	3	1							1							1			
pan	3	1							1							1			
yjdF	3	1							1							1			
cspA	18	6							6							6			
greA	1																		1
rimP	1				1														
MicX	12	4							4							4			
RsaE	4	1							1			1				1			
RsaJ	1				1														
tRNA-Sec	73	26				7			18							22			
Bacteria_large_SRP	3	1							1							1			

N: Região Núcleo

C: Região Compartilhada

E: Região Exclusiva

ncRNA	Quantidade Total	Bt407						HD-1						HD73					
		Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo		
		N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
Archaea_SRP	3	1								1						1			
Phe_leader	12	3								5						4			
MIR2118	2											2							
mir-2807	1														1				
SSU_rRNA_archaea	40	14								14						12			
SSU_rRNA_eukarya	40	14								14						12			
group-II-D1D4-1	73	3				1				20			19			25			5
sraA	5	1								2						2			
STnc40	4	1								1						2			
STnc50	2										1						1		
STnc350	2										1						1		
STnc370	4	2								1						1			
STnc320	4	1				1				1						1			
STnc230	1											1							
STnc540	1					1													
rivX	1					1													
MESTIT1_2	2										1						1		
XIST_A_REPEAT	2										1						1		
FsrA	3	1								1						1			
TtnuCD19	3	1								1						1			
TtnuHACA18	2										1						1		
GlsR16_miR3	1					1													
psRNA14	2					2													
PyrG_leader	2					2													
SR1	9	3								3						3			
SurA	5	2								1						2			
sau-19	1					1													
sau-50	11	3								3			2			3			
sau-5971	33	5								12			1			14			1
NsiR1	3	1								1						1			
snoR125	1											1							
SpF22_sRNA	2										1						1		

N: Região Núcleo

C: Região Compartilhada

E: Região Exclusiva

ncRNA	Quantidade Total	Bt407						HD-1						HD73					
		Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo			Cromossomo			Plasmídeo		
		N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
SpF25_sRNA	4	2					1						1						
SpF43_sRNA	3	1								1						1			
ncr1015	5	2					1			1			1						
ncr1175	2							1						1					
ncr1241	3	1					1						1						
ncr1575	8	2					3						3						
ohsC_RNA	1			1															
Atu_C9	14	4					5						5						
5_ureB_sRNA	2							1						1					
ToxI	12				2						5					5			
mir-965	3		2											1					
LSU_rRNA_archaea	40	14					14						12						
LSU_rRNA_bacteria	40	14					14						12						
SSU_rRNA_microsporidia	40	14					14						12						
LSU_rRNA_eukarya	40	14					14						12						
mt-tmRNA	3	1					1						1						
Spy1186876	1			1															
Spy392987	1			1															
BSnc120	25	7					9						9						
EF3314_EF3315	1											1							

ANEXO 2. Possíveis alvos preditos para o ncRNA epsC na linhagem Bt407.

Rank	Gene	Synonym	Energy	p-value	sRNA start	sRNA stop	mRNA start	mRNA stop
1	<i>comEC2</i>	BTB_c44670	-19.56	0.000	90	102	9	20
2	-	BTB_c15070	-19.32	0.000	7	26	-21	-3
3	<i>dnaC1</i>	BTB_c10000	-16.67	0.000	11	26	-77	-61
4	<i>yacO</i>	BTB_c01140	-16.14	0.000	87	98	-15	-3
5	<i>uBIE4</i>	BTB_c34110	-15.28	0.001	92	104	-22	-10
6	<i>ctaB</i>	BTB_c40780	-15.22	0.001	3	20	-16	-1
7	-	BTB_c47740	-15.11	0.001	90	107	-8	-11
8	-	BTB_c05760	-15	0.001	20	34	-16	-3
9	-	BTB_c16040	-14.81	0.001	5	21	-13	-4
10	<i>gmk</i>	BTB_c39970	-14.59	0.001	10	23	-28	-15
11	<i>ftsY</i>	BTB_c39730	-14.26	0.001	11	23	-17	-5
12	-	BTB_c56140	-13.91	0.002	11	23	-41	-29
13	<i>sigW3</i>	BTB_c36700	-13.89	0.002	13	28	-32	-17
14	<i>fabG2</i>	BTB_c36310	-13.7	0.002	86	105	-19	-1
15	<i>ctaE</i>	BTB_c40750	-13.63	0.002	84	98	-15	-3
16	<i>cccB</i>	BTB_c53780	-13.55	0.002	90	102	-19	-6
17	<i>sDR</i>	BTB_c23600	-13.47	0.003	7	26	-18	-1
18	-	BTB_c02040	-13.4	0.003	21	34	-14	-2
19	<i>ykuL</i>	BTB_c41170	-13.39	0.003	92	101	-16	-7
20	<i>lipM</i>	BTB_c43510	-13.32	0.003	11	25	-10	6
21	-	BTB_c15370	-13.31	0.003	90	98	-11	-3
22	-	BTB_c51310	-13.25	0.003	89	98	-52	-43
23	-	BTB_c25020	-13.24	0.003	86	100	-15	-3
24	-	BTB_c35210	-13.23	0.003	90	105	-21	-5
25	<i>ytjP</i>	BTB_c48580	-13.22	0.003	12	23	-19	-7
26	-	BTB_c46760	-13.22	0.003	90	99	-13	-4
27	-	BTB_c19870	-13.14	0.003	10	21	-12	1
28	<i>flaB</i>	BTB_c17010	-13.13	0.003	87	101	-18	-5
29	-	BTB_c23890	-13.04	0.004	21	32	-5	7
30	<i>tcyP</i>	BTB_c43870	-12.98	0.004	35	44	11	20
31	<i>opuAA</i>	BTB_c29040	-12.94	0.004	6	23	-31	-14
32	<i>adcA</i>	BTB_c20900	-12.76	0.004	51	62	-4	8
33	<i>gabT</i>	BTB_c03730	-12.69	0.005	11	20	-16	-7
34	<i>sucC</i>	BTB_c39620	-12.67	0.005	11	21	-13	-3
35	-	BTB_c18070	-12.61	0.005	11	21	-13	-3
36	-	BTB_c08280	-12.49	0.005	10	21	-14	-2
37	<i>abgB</i>	BTB_c32650	-12.48	0.005	89	102	-3	12
38	-	BTB_c20950	-12.25	0.006	6	25	-27	-7
39	<i>colA2</i>	BTB_c31330	-12.07	0.007	84	104	-19	1
40	-	BTB_c48420	-12.03	0.007	21	37	-18	-2
41	-	BTB_c38980	-11.95	0.008	14	26	-14	-2
42	<i>dadA</i>	BTB_c29540	-11.72	0.009	19	34	-13	4
43	-	BTB_c34560	-11.7	0.009	90	98	-15	-7
44	-	BTB_c55050	-11.59	0.010	75	85	-77	-67
45	-	BTB_c49010	-11.56	0.010	12	26	-20	-6
46	<i>thiN</i>	BTB_c39850	-11.56	0.010	66	79	-78	-65
47	<i>ald1</i>	BTB_c06070	-11.55	0.010	87	98	-15	-4
48	-	BTB_c27090	-11.52	0.010	13	23	-7	4
49	-	BTB_c42430	-11.5	0.010	10	21	-17	-5
50	<i>ylaL</i>	BTB_c40830	-11.49	0.010	89	101	-16	-4
51	-	BTB_c49540	-11.47	0.010	12	26	-18	-5
52	-	BTB_c31440	-11.46	0.010	89	104	-16	-2
53	-	BTB_c51200	-11.45	0.011	13	26	-20	-6
54	<i>catE2</i>	BTB_c45000	-11.3	0.012	88	101	-19	-6
55	-	BTB_c52490	-11.29	0.012	43	60	-54	-36
56	-	BTB_c02210	-11.17	0.012	1	14	2	16
57	-	BTB_c14910	-11.16	0.013	88	105	-20	-4
58	<i>vat</i>	BTB_c27390	-11.06	0.013	76	88	-17	-5
59	-	BTB_c18360	-11.03	0.013	12	23	-20	-8
60	-	BTB_c22740	-11.03	0.014	11	21	-13	-3

61	-	BTB_c19260	-10.81	0.015	67	84	-8	13
62	<i>ykoY</i>	BTB_c13530	-10.72	0.016	21	37	-79	-63
63	-	BTB_c31430	-10.63	0.017	85	98	-14	1
64	-	BTB_c06080	-10.6	0.017	86	98	-14	1
65	-	BTB_c09210	-10.59	0.017	7	18	-2	10
66	-	BTB_c42150	-10.57	0.017	10	21	-11	1
67	-	BTB_c21390	-10.46	0.018	22	34	-12	-1
68	<i>maa2</i>	BTB_c48150	-10.45	0.019	21	37	-13	4
69	-	BTB_c10730	-10.31	0.020	20	35	1	15
70	<i>sbcC2</i>	BTB_c23790	-10.26	0.020	1	15	-80	-65
71	<i>ogt</i>	BTB_c20940	-10.26	0.020	12	26	-18	-3
72	<i>nadD</i>	BTB_c44740	-10.17	0.021	106	118	-50	-39
73	<i>ywlC</i>	BTB_c55270	-10.12	0.022	67	77	-25	-15
74	-	BTB_c16970	-10.11	0.022	12	26	-13	1
75	<i>kbaA</i>	BTB_c01710	-10.09	0.022	92	102	-17	-7
76	-	BTB_c34540	-10.06	0.023	90	98	-13	-5
77	-	BTB_c44820	-10.06	0.023	50	62	-4	9
78	-	BTB_c00830	-9.9	0.025	21	38	-18	-2
79	<i>yheC</i>	BTB_c09450	-9.84	0.025	83	95	2	14
80	<i>rbsD</i>	BTB_c06820	-9.81	0.026	83	97	-60	-46
81	-	BTB_c11760	-9.8	0.026	9	28	-6	13
82	-	BTB_c13030	-9.74	0.027	12	21	-12	-3
83	<i>mccB</i>	BTB_c45120	-9.72	0.027	11	20	-17	-8
84	-	BTB_c30260	-9.69	0.027	88	101	-16	-2
85	<i>tRAP</i>	BTB_c11340	-9.67	0.027	88	104	-19	-3
86	-	BTB_c45580	-9.62	0.028	1	18	-17	-2
87	<i>phoR4</i>	BTB_c48230	-9.61	0.028	10	22	-28	-15
88	<i>colA3</i>	BTB_c36010	-9.55	0.029	88	98	-34	-23
89	-	BTB_c18390	-9.53	0.029	86	99	-15	-2
90	-	BTB_c40050	-9.5	0.030	89	101	-16	-2
91	-	BTB_c13900	-9.33	0.032	65	79	-28	-15
92	<i>cysU</i>	BTB_c11590	-9.31	0.032	11	27	-11	7
93	-	BTB_c27060	-9.3	0.033	97	111	7	20
94	-	BTB_c52290	-9.3	0.033	13	26	-5	10
95	<i>holA</i>	BTB_c44650	-9.27	0.033	23	40	-21	-6
96	<i>glnT3</i>	BTB_c52840	-9.25	0.033	90	98	-16	-8
97	<i>vanS5</i>	BTB_c50090	-9.21	0.034	26	40	-26	-13
98	<i>citT2</i>	BTB_c09950	-9.02	0.037	88	101	-77	-64
99	-	BTB_c19450	-9.02	0.037	12	29	-8	11
100	-	BTB_c51400	-8.99	0.037	21	34	-75	-61
101	-	BTB_c10700	-8.99	0.037	87	101	-18	-4
102	<i>moaA1</i>	BTB_c21860	-8.98	0.038	3	15	-10	5
103	<i>yunG</i>	BTB_c18430	-8.83	0.040	79	88	-64	-55
104	-	BTB_c54100	-8.8	0.041	19	33	-71	-57
105	<i>brnQ3</i>	BTB_c18900	-8.74	0.042	91	103	-18	-6
106	-	BTB_c51840	-8.73	0.042	89	106	-7	14
107	-	BTB_c44730	-8.71	0.042	4	21	-15	4
108	<i>ydbB</i>	BTB_c47730	-8.5	0.046	11	25	-21	-7
109	-	BTB_c10870	-8.46	0.047	20	33	-13	1
110	-	BTB_c05720	-8.45	0.047	66	80	-16	1
111	<i>rocE</i>	BTB_c06570	-8.35	0.049	3	20	-11	5
112	<i>dacF</i>	BTB_c42120	-8.35	0.049	4	19	-13	4

ANEXO 3. Possíveis alvos preditos para o ncRNA epsC na linhagem HD73.

Rank	Gene	Synonym	Energy	p-value	sRNA start	sRNA stop	mRNA start	mRNA stop
1	-	HD73_1062	-20.28	0.000	11	26	-77	-61
2	-	HD73_2566	-16.63	0.000	11	26	-18	-3
3	-	HD73_0169	-15.28	0.001	21	34	-14	-2
4	-	HD73_3611	-15.1	0.001	6	19	-20	-9
5	-	HD73_4130	-14.75	0.001	11	23	-17	-5
6	-	HD73_4156	-14.59	0.001	10	23	-28	-15
7	-	HD73_1048	-14.27	0.001	43	61	-80	-61
8	-	HD73_3864	-13.75	0.002	13	28	-32	-17
9	-	HD73_3534	-13.62	0.002	10	21	-52	-41
10	-	HD73_5827	-13.55	0.002	11	23	-41	-29
11	-	HD73_5886	-13.55	0.002	90	103	-18	-6
12	-	HD73_4513	-13.32	0.003	11	25	-10	-6
13	-	HD73_1538	-13.1	0.003	21	37	-79	-63
14	-	HD73_4978	-13.07	0.004	12	21	-13	-4
15	-	HD73_2594	-13.04	0.004	21	32	-5	-7
16	-	HD73_2489	-13.02	0.004	88	102	-69	-56
17	-	HD73_1352	-13.01	0.004	11	26	-12	6
18	-	HD73_1121	-12.94	0.004	89	99	-15	-5
19	-	HD73_2473	-12.81	0.004	23	34	-13	-2
20	-	HD73_2408	-12.73	0.005	67	78	-13	-2
21	-	HD73_4943	-12.72	0.005	90	99	-30	-21
22	-	HD73_4728	-12.68	0.005	17	31	-4	10
23	-	HD73_4119	-12.67	0.005	11	21	-13	-3
24	-	HD73_2007	-12.61	0.005	11	21	-13	-3
25	-	HD73_5370	-12.54	0.005	13	26	-5	10
26	-	HD73_0782	-12.5	0.005	7	21	-12	2
27	-	HD73_0870	-12.49	0.005	10	21	-14	-2
28	-	HD73_4948	-12.45	0.006	87	99	8	20
29	-	HD73_5013	-12.32	0.006	12	23	-19	-7
30	-	HD73_3095	-12.29	0.006	20	34	-39	-25
31	-	HD73_1798	-12.22	0.006	67	78	-14	-3
32	-	HD73_2714	-12.2	0.007	92	103	-17	-6
33	-	HD73_4997	-12.01	0.007	21	37	-18	-2
34	-	HD73_3985	-11.88	0.008	12	26	-17	-3
35	-	HD73_0115	-11.85	0.008	88	99	-13	-2
36	-	HD73_1695	-11.82	0.008	21	34	-9	4
37	-	HD73_0778	-11.79	0.009	12	26	-9	5
38	-	HD73_5429	-11.69	0.009	22	35	-58	-44
39	-	HD73_5390	-11.68	0.009	43	57	-51	-36
40	-	HD73_2332	-11.6	0.010	12	26	-10	5
41	-	HD73_3505	-11.55	0.010	88	103	-16	-3
42	-	HD73_4407	-11.5	0.010	10	21	-17	-5
43	-	HD73_0590	-11.46	0.011	92	102	-18	-8
44	-	HD73_4915	-11.35	0.011	8	25	-21	-4
45	-	HD73_5503	-11.28	0.012	14	26	-14	-2
46	-	HD73_4110	-11.12	0.013	88	102	-40	-26
47	-	HD73_5166	-11.11	0.013	13	27	-21	-7
48	-	HD73_0417	-11.09	0.013	11	26	-12	4
49	-	HD73_2352	-11.06	0.013	21	34	-9	7
50	-	HD73_1665	-11.03	0.013	88	105	-22	-5
51	-	HD73_2483	-11.03	0.014	11	21	-13	-3
52	-	HD73_2877	-11.02	0.014	21	40	-55	-35
53	-	HD73_3196	-10.84	0.015	10	23	-31	-17
54	-	HD73_3812	-10.79	0.015	2	15	-14	-3
55	-	HD73_0174	-10.72	0.016	11	26	-20	-6
56	-	HD73_2893	-10.7	0.016	88	99	-15	-4
57	-	HD73_4289	-10.62	0.017	93	103	-41	-31
58	-	HD73_2202	-10.55	0.018	7	25	-9	12
59	-	HD73_1606	-10.49	0.018	3	14	-14	-3
60	-	HD73_3124	-10.43	0.019	11	22	-20	-8

61	-	HD73_4637	-10.41	0.019	4	21	-15	4
62	-	HD73_1168	-10.4	0.019	20	35	1	15
63	-	HD73_3442	-10.29	0.020	88	99	-14	-3
64	-	HD73_2201	-10.26	0.020	12	26	-18	-3
65	-	HD73_0715	-10.25	0.021	21	34	-10	4
66	-	HD73_1139	-10.04	0.023	90	99	-14	-5
67	-	HD73_0384	-9.89	0.025	13	26	-21	-7
68	-	HD73_5308	-9.82	0.026	93	105	-22	-10
69	-	HD73_4053	-9.78	0.026	85	99	-13	1
70	-	HD73_5162	-9.69	0.027	20	40	-26	-9
71	-	HD73_2564	-9.62	0.028	85	99	-15	-1
72	-	HD73_0074	-9.61	0.028	21	38	-18	-2
73	-	HD73_0632	-9.6	0.028	20	34	-16	-3
74	-	HD73_5494	-9.58	0.029	49	65	-75	-59
75	-	HD73_3572	-9.55	0.029	34	47	-64	-51
76	-	HD73_3976	-9.5	0.030	89	102	-16	-3
77	-	HD73_1468	-9.44	0.031	88	99	-62	-50
78	-	HD73_1835	-9.43	0.031	89	103	-18	-4
79	-	HD73_3550	-9.43	0.031	19	30	-73	-62
80	-	HD73_5848	-9.41	0.031	89	104	-16	1
81	-	HD73_0285	-9.35	0.032	107	122	-80	-66
82	-	HD73_1248	-9.34	0.032	11	27	-11	7
83	-	HD73_2961	-9.34	0.032	11	20	-11	-2
84	-	HD73_3172	-9.32	0.032	7	20	-19	-5
85	-	HD73_4628	-9.27	0.033	23	40	-21	-6
86	-	HD73_3248	-9.24	0.033	22	34	-10	6
87	-	HD73_1577	-9.2	0.034	66	80	-25	-12
88	-	HD73_5501	-9.11	0.036	70	80	-9	2
89	-	HD73_5679	-8.96	0.038	13	26	-9	4
90	-	HD73_0280	-8.94	0.038	14	26	-14	-2
91	-	HD73_5261	-8.87	0.039	6	22	-18	-2
92	-	HD73_2275	-8.87	0.039	6	22	-18	-2
93	-	HD73_2041	-8.83	0.040	80	89	-64	-55
94	-	HD73_1159	-8.81	0.040	87	102	-71	-57
95	-	HD73_5062	-8.79	0.041	22	33	-15	-4
96	-	HD73_3811	-8.69	0.042	8	26	-77	-60
97	-	HD73_2391	-8.69	0.043	88	104	-18	-2
98	-	HD73_3102	-8.68	0.043	2	22	-6	15
99	-	HD73_1946	-8.67	0.043	20	34	-9	5
100	-	HD73_2599	-8.63	0.044	21	34	-13	-1
101	-	HD73_3909	-8.58	0.044	88	107	-20	-1
102	-	HD73_0388	-8.58	0.044	108	124	-34	-18
103	-	HD73_2428	-8.54	0.045	12	25	-20	-6
104	-	HD73_4493	-8.48	0.046	110	125	-6	11
105	-	HD73_2797	-8.46	0.047	91	103	-17	-5