

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **tese** será disponibilizado somente a partir de 29/07/2021.

GRACIELY GOMES CORRÊA

**Desenvolvimento e padronização de um sistema de autoindução da expressão gênica em *Bacillus subtilis***



GRACIELY GOMES CORRÊA

## **Desenvolvimento e padronização de um sistema de autoindução da expressão gênica em *Bacillus subtilis***

Tese de Doutorado, apresentada ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em **Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia**, área de concentração: Biotecnologia. – Unesp/Araraquara, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Exemplar apresentado para defesa de doutorado.

**Linha de pesquisa:** Biotecnologia diagnóstica, Bioprodutos e Biofármacos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli

**Bolsa:** Brasil (CAPES) 001

**Doutorado sanduíche:** Alemanha, Doutorado CAPES/DAAD/CNPq, Edital nº 15/2017

**Projeto:** FAPESP Processo 2014/17564-7

---

**C824d** Corrêa, Graciely Gomes.  
Desenvolvimento e padronização de um sistema de autoindução da expressão gênica em *Bacillus subtilis* / Graciely Gomes Corrêa. – Araraquara, 2019.  
78 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Biotecnologia e Biologia Sintética.

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. Quorum-sensing. 2. Sistema lux. 3. *Bacillus subtilis*. 4. Biologia sintética. 5. Expressão gênica. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030081P7**  
**Esta ficha não pode ser modificada**

*Esta tese foi realizada com todo carinho e dedicação, com ajuda de muitos amigos, companheiros de profissão, pessoas as quais me orgulho bastante de ter conhecido. Apesar dos meandros no caminho, a vida nos leva a participar de enredos singulares e incomuns e contrastando com prazos e estresses da pós-graduação, o labor foi muito divertido. Dedico, pois, esse trabalho à vida, cuja simplicidade nos faz galgar nosso percurso com determinação e coragem; e aos sonhos, como força motriz do engrandecimento da alma.*

## SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi desenvolvido no departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP/Araraquara, sob orientação da prof. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli, e no Institute for Technical Microbiology na Faculty for Biotechnology na Mannheim University of Applied Sciences/ Alemanha, sob a supervisão do prof. Dr. Matthias Mack.

O doutorado foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, com bolsa de doutorado concedida pelo Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicados à Farmácia, regulamento PROEX – IES Públicas nº do processo 88882.330104/2018-01.

O doutorado sanduíche na Hochschule Mannheim/Alemanha teve o período de 01/02/2018 – 31/03/2019, e foi aprovado pelo EDITAL N° 15/2017 - Programa doutorado sanduíche na Alemanha CAPES/DAAD/CNPQ, nº do processo 88887.161394/2017-00.

A tese é parte integrante do projeto Jovem Pesquisador “Reprogramação do metabolismo de purina em *Bacillus subtilis* através de tecnologia de sRNA” da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo FAPESP 2014/17564-7.

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, me proporcionando conhecimento e força nas minhas realizações e me mostrando sempre o melhor caminho a seguir. Estarás sempre no comando da minha vida.*

*Aos meus pais, Gracilene e José, ao meu irmão, Gleyton e minha cunhada, Luana, pelo apoio, carinho e paciência. A melhor família do mundo! Desculpem a ausência!*

*À minha doce e traquina sobrinha Maria que, por muitas vezes, achou que a tia era um porta retrato. Nascida pouco antes da viagem para Alemanha, convivemos pouco tempo, mas que levei no âmago do meu peito para um país estrangeiro. Nos reencontramos após 14 meses e nos reconhecemos por um singelo e profundo olhar.*

*À minha orientadora professora Dra. Danielle Biscaro Pedrolli, pela paciência, carinho e por compartilhar seus conhecimentos em biologia sintética comigo e todos os seus orientados de forma especial. Descobrimos como é fantástico e divertido “brincar de lego” com as “peças do DNA” com toda responsabilidade e empenho para ajudar à sociedade, que sempre me impulsionava a aprender mais e perder a hora várias vezes no laboratório. Ensinos são eternos.*

*Aos meus amigos do laboratório Synbio/UNESP Araraquara: Milca, Dani, Rafael, Gaby, Vitória, Nathan, Paulo, Patrick, Carol, Victor, Bruna, Laura, Daniel, Juliano, Joyce, Mariana, Flávio, Caio. Muito bom trabalhar com vocês e ter os conhecidos, turma sempre unida. Adoro a energia positiva que vocês me passam.*

*Aos técnicos do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Flávio, Mateus, Adriana e Ana. E especialmente ao suporte do Flávio por manter a organização do nosso lab e pela dedicação.*

*À todos os professores do Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.*

*Aos professores do Departamento de Biotecnologia e Bioprocessos: Danielle, Valéria, Jorge, Marcel, Ariela, Álvaro, Guilherme. Pelo suporte profissional e por trabalharem com o coração!*

*Ao prof. Dr. Matthias Mack, por ter nos co-orientado na Alemanha e nos recebido de forma muito agradável, cooperativa e preocupada em seu laboratório de Microbiologia Aplicada na Hochschule Mannheim.*

*Aos companheiros de laboratório do MIB da Hochschule Mannheim: Carmen, Ben, Rodrigo, Lena, Ahmed. Sempre presentes e dispostos a trocar conhecimento. E aos outros colegas que conhecemos na Hochschule e compartilharam um pouco da sua estória conosco.*

*Aos técnicos da Hochschule Mannheim: Cristiane, Chrissi, Michel, Kasting, Sonja. Por estarem sempre disposto a ajudar.*

*À professora Dra Andréa Maria André Gomes, minha orientadora da graduação e de monitoria em microbiologia, pela excelente carta de recomendação para seleção do doutorado sanduíche e por estar sempre na torcida do meu crescimento profissional.*

*Ao esposo da prof. Danielle, Sr. Gerson, por conseguir nossa residência em Mannheim e nos informar sobre burocracias, cultura Alemã, transporte e outras orientações no idioma.*

*À equipe do curso de Alemão Carl Duisberg Centrum Munchen, pelo curso intensivo de Alemão durante dois meses quando cheguei em Munique. Não só pelas aulas de alemão, mas também pela inserção na cultura.*

*Aos amigos que fiz durante a estadia em Munique e perpetuaram para todo o ano na Alemanha: Juliana, Cesar, Débora Rezende, Rafael, Lucas, Rômulo, Milca, Victor, Adrian, Alexandre, Débora, Paula. Vocês foram um alicerce forte nesse período!*

*À minha amiga Milca Lins, é claro que essa chatinha precisava de um parágrafo especial, minha companheira de aventuras, minha confidente e minha grandeee amiga que me aturou esse tempo todo, dando toda a força do mundo, uma garota maravilhosa. Nossa saga perdurou desde o mestrado no Departamento de Antibióticos da UFPE, passando por*



*aprender a plantar feijõezinhos na Embrapa Meio Ambiente-Jaguariúna/SP, aprendendo novas tecnologias em Biologia Sintética na UNESP/Araraquara e fomos contempladas pelo edital de doutorado sanduíche juntas para Alemanha. Mas ela ainda precisa aprender a fazer café depois de todo esse tempo. Rsrs. Obrigada por todo o apoio!*

*Aos amigos dos jogos de tabuleiro e clube de luta Yi-Ba Dao de Mannheim: Martin, o pequeno Ben, Tobias, Carmelo, Melanie, Hannah, Miriam, Katrin, entre outros. Obrigada pelo fortalecimento físico e espiritual! E aos ensinamentos da maneira de ver o mundo do ponto de vista do Kung-Fu, meditações e práticas Budistas. A estadia na Alemanha me proporcionou o convívio com diferentes nacionalidades e culturas, o que ampliou minha forma de ver o mundo.*

*Aos companheiros do Clã Insanos do Clash Royale, sempre na meta: Rumo ao Top Royale Brasil. Sempre compreensíveis nas cobranças porque estava elaborando a tese.*

*Aos amigos de Recife, que continuaram dando apoio para seguir em frente e sondando sobre minha saúde mental na pós-graduação: Hélder, Mayara, Wellma, Kamila, Henrique, Laury e Paulo.*

*Ao projeto de extensão “Entendendo a Astronomia: um incentivo ao aprendizado de Matemática e Física”, organizado pelo prof. Guilherme, a Maísa e o Cauê. Por propagarem conhecimento e me mostrarem a imensidão do céu, isso me tranquilizou bastante durante os estresses dos experimentos e ampliou minha energia por pausar para admirar a simplicidade da natureza.*

*À oportunidade de participação no iGEM 2017, competição internacional de máquinas geneticamente engeiradas. Fico feliz em ter contribuído um pouco!*

*Às minhas bactérias iluminadas, que me fizeram ir muitos finais de semana e feriados só pela curiosidade do próximo passo. Será que a bactéria transformou? Tem que mudar de cor. Vai ter colônia positiva na placa? Espero que a enzima tenha digerido nesse tempo hábil. Ain... preciso cuidar dos meus “bichinhos”, vou colocar música para crescerem melhor.*

*Aos meus amigos e familiares, especialmente pela minha ausência e privações nesse período. Peço desculpas por isso, mas agradeço a compreensão e por nunca desistirem de mim, enfim, vocês não me deixaram cair.*

*À CAPES, ao DAAD e à FAPESP pelo apoio financeiro concedido.*

*À UNESP e ao Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicado à Farmácia por abrirem as portas para a realização desse trabalho.*

*A todos que contribuíram de forma direta ou indireta com o desenvolvimento deste trabalho e compartilhando meus sonhos, meu MUITOOO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!!*

Graciely Gomes Corrêa

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

*Johann Goethe*

## RESUMO

---

### **Desenvolvimento e padronização de um sistema de autoindução da expressão gênica em *Bacillus subtilis***

Os métodos de indução da expressão gênica disponíveis para linhagens bacterianas envolvem a adição de compostos indutores ao meio de cultura (por exemplo, isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo, xilose e arabinose), o que é indesejável para linhagens industriais, pois encarece o processo produtivo. Já a utilização da expressão constitutiva, alternativa à indução, pode ocasionar stress metabólico durante a fase *lag* de crescimento quando são utilizados promotores fortes. O objetivo do trabalho foi construir e padronizar um novo modelo de indução da expressão gênica para linhagens bacterianas industriais. O novo modelo de autoindução baseado no sistema de *quorum-sensing* bacteriano, permitindo que a célula se automonitora e induza a expressão gênica durante a fase exponencial de crescimento, eliminando assim não só a necessidade de adição de composto indutor como a necessidade de monitoramento da densidade celular pré-indução. Realizou-se amplificação e clonagem dos genes *luxR* e *luxI*, com e sem caudas de histidina, e suas respectivas sequências regulatórias de *Aliivibrio fischeri*, em plasmídeo contendo os genes responsáveis pela bioluminescência ou fluorescência com códon otimizados para *Bacillus subtilis*. Em seguida, foi realizada transformação e a integração do plasmídeo no cromossomo de *B. subtilis*. A funcionalidade do sistema foi avaliada em diferentes etapas de crescimento microbiano com o auxílio de um leitor de microplacas durante intervalos regulares. O sistema de autoindução mostrou-se funcional em *B. subtilis*, com indução acentuada da expressão do gene repórter, disposto *downstream* ao promotor *Plux*, durante a fase exponencial de crescimento. Verificou-se ainda que a inserção do sistema baseado no *quorum-sensing* não afetou o crescimento do microrganismo significativamente. Foram desenvolvidas e testadas dez otimizações do sistema inicial, com alterações na sequência do promotor *Plux*. Através dessas otimizações, construímos linhagens com diferentes níveis de expressão do sistema de autoindução e força do promotor variável. Ao caracterizar os sistemas, foi constatado alto nível de modularidade, podendo ser utilizados em diferentes linhagens de *B. subtilis*, diferentes contextos genéticos e para a produção de diferentes produtos. O modelo de indução desenvolvido se mostrou funcional e modular e poderá ser adaptado a diferentes espécies e compostos, configurando uma nova ferramenta para a biologia sintética.

**Palavras-chave:** *Quorum-sensing*. Sistema *lux*. *B. subtilis*. Biologia sintética. Expressão gênica.

## ABSTRACT

---

### **Development and standardization of a gene expression system autoinductor in *Bacillus subtilis***

Current methods available for the autoinduction of gene expression in genetically engineered bacterial strains require addition of inducing compounds to the culture medium (e.g. Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, xylose, and arabinose), which is undesirable for industrial strains due to additional costs to the production process. Alternatively, constitutive gene expression is employed. However, the later can possibly cause metabolic stress during the *lag* growth phase if strong promoters are employed. The objective of this work was to construct and to standardize a new model for induction of gene expression in industrial bacterial strains. The new model is based on an autoinduction process triggered by the bacterial *quorum-sensing* system. It allows the cell to monitor itself and induce its own gene expression during the exponential growth phase, thereby eliminating both the need for an external inducing compound and the need for monitoring pre-inducing cell density. Bacterial cultures were grown in rich media, supplemented or not with antibiotics. Amplification and cloning of *luxR* and *luxI* genes, with and without histidine tags, and their respective regulatory sequences of *Aliivibrio fischeri*, were performed on a plasmid containing the genes responsible for bioluminescence or fluorescence with codons optimized for *Bacillus subtilis*. Next, transformation and integration of the plasmid into the *B. subtilis* chromosome were performed. The functionality of the system was evaluated at different stages of microbial growth, by luminescence or fluorescence measurement at regular intervals, using a microplate reader. The autoinduction system promoted accentuated induction of reporter gene expression located downstream of the Plux promoter during the exponential growth phase. It was also found that the insertion of the *quorum-sensing* system did not significantly affect the microorganism growth. Ten variations of the autoinduction system were generated and tested, which consisted of optimizations of the Plux promoter. Through the optimizations, we constructed strains showing a range of gene expression fold change and an array of promoter strengths. The constructed autoinduction systems show high level modularity, as they are functional in different strains of *B. subtilis*, in different genetic contexts and can efficiently control the production of different products. The developed induction model proved to be functional and modular, and it could be adapted to different species and compounds, configuring a new tool for synthetic biology.

**Keywords:** *Quorum-sensing*. *Lux* system. *B. subtilis*. Synthetic biology. Gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1.** A via sintética do AHL (3-oxo-C6-HSL neste caso) (Fonte: HORINOUCI *et al.*, 2010). ..... 21
- Figura 2.** Curva de crescimento típica de uma população bacteriana em sistema descontínuo. Uma contagem de viáveis mede as células presentes na cultura capazes de se reproduzir. A densidade óptica (turbidez), uma medida quantitativa da dispersão de luz por uma cultura líquida, aumenta de acordo com o aumento do número de células (Fonte: MADIGAN *et al.*, 2016). ..... 23
- Figura 3.** A interação da RNAP com um promotor bacteriano. Apresentadas abaixo da RNAP e do DNA encontram-se seis sequências promotoras diferentes identificadas em *Escherichia coli*. São apresentados os contatos da RNAP com a região -35 e com a caixa de Pribnow (sequência -10). A transcrição inicia-se em uma base específica, imediatamente *downstream* à caixa de Pribnow. Abaixo das sequências reais das regiões -35 e da caixa de Pribnow estão as sequências-consenso, derivadas de comparações realizadas entre muitos promotores. Observe que, embora sigma reconheça as sequências do promotor na fita 5' - 3' do DNA (em verde-escuro), a enzima cerne da RNAP transcreve, de fato, a fita em verde-claro, com sentido 3' - 5', uma vez que a enzima cerne atua apenas na direção 3' - 5' (Fonte: MADIGAN *et al.*, 2016). ..... 24
- Figura 4.** Estrutura estável da proteína verde fluorescente GFP. A seta azul indica absorção de luz azul ou ultravioleta e a seta verde emissão de luz verde (Fonte: Adaptado de: <https://pt.slideshare.net/TBQ-RLORC/green-fluorescent-protein-gfp/6>, 2019). ..... 27
- Figura 5.** Reações químicas exergônicas da luciferase de vagalume e a bacteriana com liberação de fótons de luz (Fonte: Adaptado de: HYONE-MYONG EUN, 1996). ..... 28
- Figura 6.** Cultivo de *B. subtilis* em placa de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani) acrescido de ágar. À esquerda, *B. subtilis* Marburg 168 (tipo selvagem); à direita, linhagem industrial de *B. subtilis* superprodutora de riboflavina. Apesar dos dois cultivos terem sido incubados pelo mesmo período e temperatura (16h a 37 °C), a linhagem industrial apresentou crescimento visivelmente inferior ao tipo selvagem, devido ao stress gerado pela produção de riboflavina em grande quantidade desde a fase lag de crescimento (Fonte: cultivo e foto de Danielle B. Pedrolli, 2016). ..... 30
- Figura 7.** Plasmídeos utilizados com padrão BioBrick. Para facilitar a clonagem, todos possuem cassete bla para resistência à ampicilina e uma origem de replicação em *E. coli* (ori). As partes integrativas contêm regiões homólogas franqueadoras, um cassete de resistência para seleção em *B. subtilis* e o sítio de clonagem múltipla (MCS), contendo um cassete *rfp* flanqueado por sítios de restrição *EcoRI*, *NotI*, *XbaI* (*upstream*) e *SpeI*, *NotI* e *PstI* (*downstream*). **Plasmídeo pBs3Clux**, integra-se ao *locus sacA* em *B. subtilis*. Contém: Genes da luminescência (*luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD*, *luxE*) em laranja, sítios de integração ao genoma de *B. subtilis* (*sacA* e *sacA'*) em cinza, origem de replicação em *E. coli* (ori) em cinza claro, genes de resistência à ampicilina (*bla*) em verde claro e ao cloranfenicol (*cat*) em verde escuro, sítio de clonagem múltipla (MCS), com gene *rfp* (cassete com sítios para as enzimas de restrição *EcoRI*, *NotI*, *XbaI*, *SpeI*, *NotI* e *PstI*). **Plasmídeo pBS1C**, integra-se ao *locus amyE* em *B. subtilis*. Contém: Sítios de integração ao genoma de *B. subtilis* (*amyE* e *amyE'*)

em cinza, origem de replicação em *E. coli* (ori) em cinza claro, genes de resistência à ampicilina (*bla*) em verde claro e ao cloranfenicol (*cat*) em verde escuro. **Plasmídeo pBS2E**, integra-se ao locus *lacA* em *B. subtilis*. Contém: Sítios de integração ao genoma de *B. subtilis* (*lacA* e *lacA'*) em cinza, origem de replicação em *E. coli* (ori) em cinza claro, genes de resistência à ampicilina (*bla*) em verde claro e a eritromicina (*erm*) em verde escuro. Ambos com sítio de clonagem múltipla (MCS), com gene *rfp* (cassete com sítios para as enzimas de restrição *EcoRI*, *NotI*, *XbaI*, *SpeI*, *NotI* e *PstI*) (Fonte: RADECK *et al.*, 2013). ..... 32

**Figura 8.** Sítios de clonagem completo BioBrick para suportar a montagem de peças biológicas padrão BioBrick (Fonte: <http://agapakis.com/hssp/biobricks.html>, 2017). ..... 34

**Figura 9.** Ilustração do fluxo de trabalho para determinação da funcionalidade dos sistemas de autoindução construídos. Sequência: Plasmídeos integrados ao genoma de *B. subtilis*; placa de uma das transformações; teste em mesa agitadora (Fonte: A AUTORA, 2019; FREE VECTORS ICONS, 2019)..... 38

**Figura 10.** Ilustração do fluxo de trabalho para determinação da funcionalidade dos sistemas de autoindução construídos. Sequência: plasmídeos integrados no genoma de *B. subtilis*; placa de uma das transformações; teste com cultivo em leitora de microplacas (Fonte: A AUTORA, 2019; FREE VECTORS ICONS, 2019)..... 39

**Figura 11.** Adaptação do sistema de *quorum-sensing* de *A. fischeri* para construção de um sistema de autoindução em *B. subtilis*. A parte superior da figura mostra o funcionamento do sistema de *quorum-sensing* em *A. fischeri*. A enzima LuxI sintetiza acil-homoserina lactona (AHL) que por difusão entra e sai das células até que um limiar de concentração seja atingido. A partir desse ponto, as moléculas de AHL ligam-se à proteína regulatória LuxR, ativando-a. O complexo LuxR-AHL ativa então o promotor do operon *lux*, que codifica as proteínas responsáveis pela emissão de bioluminescência. O mesmo complexo ainda reprime a ação do promotor de *luxR*, gene que até então era expresso constitutivamente. Como indicado na parte inferior da figura, a sequência completa *luxR-R-luxI* será inserida no cromossomo de *B. subtilis*. Uma vez que o sistema esteja funcional, qualquer gene X, que seja inserido em *B. subtilis* sob controle da mesma sequência regulatória R, responderá ao sistema de indução por *quorum-sensing* (A AUTORA, 2019). ..... 41

**Figura 12.** Teste de degradação do amido. As bactérias são semeadas em meio Luria-Bertani com amido solúvel e após crescimento overnight, é adicionada uma solução de lugol. Sempre é semeado em conjunto um controle negativo para comparar o halo de inibição e se o teste funcionou adequadamente. Se apresentar o halo de inibição significa que o microrganismo continua degradando amido, ou seja, o plasmídeo não foi inserido no locus *amy*. Se não apresentar halo de degradação, o plasmídeo foi inserido e seleciona-se a bactéria para a PCR de colônia. Em: 1. Todas as colônias foram positivas comparadas ao controle; 2. Teste realizado na mesma placa para melhor visualização dos halos (Fonte: A AUTORA, 2019)...43

**Figura 13.** Transformação em *E. coli* utilizando o plasmídeo contendo *rfp*. Placas com meio Luria-Bertani sólido com adição de antibiótico ampicilina. As setas azuis indicam as colônias vermelhas (falsas colônias). Em: 1. Controle negativo, onde foi utilizado o plasmídeo digerido na transformação sem adição dos insertos; 2. Transformação em que foi utilizado 50µL para espalhamento em placa; 3. Transformação em que foi utilizado 100µL para espalhamento em placa; 4. Ampliação da placa 3 mostrando a diferenciação das colônias brancas e vermelhas (Fonte: A AUTORA, 2018)..... 44

**Figura 14.** Clones primeiramente elaborados. pBs3Clux com plasmídeo vazio (controle negativo); com promotor constitutivo *srfA* (controle positivo); com o sistema autoindutivo *luxRI* e o mesmo sistema contendo cauda de histidina (Fonte: A AUTORA, 2017). ..... 45

**Figura 15.** Representação esquemática dos circuitos gênicos utilizados para o teste de bioluminescência. Os plasmídeos da figura foram inseridos no cromossomo de *B. subtilis*. O plasmídeo pBs3Clux é representado na figura com os genes *luxCDABE*. Em: 1. Sistema de autoindução desenvolvido; 2. Controle positivo; 3. Controle negativo (Fonte: A AUTORA, 2019). ..... 46

**Figura 16.** Avaliação da bioluminescência dos *B. subtilis* transformados em função do tempo e densidade celular. **A.** Genes da bioluminescência sem controle do promotor. **B.** Genes de bioluminescência sob controle do promotor *srfA*. **C.** Genes de bioluminescência sob controle do sistema *luxRI*. **D.** Genes de bioluminescência sob controle do sistema *luxRI* com cauda de histidina (Fonte: A AUTORA, 2019). ..... 47

**Figura 17.** Representação do sistema de autoindução de *A. fischeri* inserido no cromossomo de *B. subtilis*. As unidades de transcrição foram separadas e o circuito gênico desacoplado. P: promotor; Plux: duplicação do promotor com modificações; R: Sequência regulatória; X: produto a ser gerado, no caso dos ensaios de funcionalidade, o gene repórter (Fonte: A AUTORA, 2019). ..... 49

**Figura 18.** Construções do sistema de autoindução realizadas nesse trabalho. A primeira coluna apresenta os modelos sem His-tag, clonados com os Plux 1.1; 3.1; 3.2. A segunda e terceira colunas apresentam os modelos com His-tag, notadamente Plux 1.1; 2.1; 3.1; 3.2; 4.1; 5.1. Uma das construções do Plux 3.2 foi realizada com a riboJ (Fonte: A AUTORA, 2019). ..... 51

**Figura 19.** Avaliação da bioluminescência dos *B. subtilis* transformados em função do tempo e densidade celular. Cultivo realizado em leitora de microplacas TECAN. **A.** Controle negativo sem promotor. **B.** Promotor *srfA*. **C.** Sistema *luxRI*. **D.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina. **E.** Sistema *luxRI* associado ao promotor Plux 1.1. **F.** Sistema *luxRI* e do promotor Plux 3.1. **G.** Sistema *luxRI* associado ao promotor Plux 3.2. **H.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina e associado ao promotor Plux 1.1. **I.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina e associado ao promotor Plux 2.1. **J.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina e associado ao promotor Plux 3.1. **K.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina e associado ao promotor Plux 3.2. **L.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina e associado ao promotor Plux 3.2, contendo riboJ. **M.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina e associado ao promotor Plux 4.1. **N.** Sistema *luxRI* com cauda de histidina e associado ao promotor Plux 5.1 (Fonte: A AUTORA, 2019). 53

**Figura 20.** Curva de crescimento bacteriano da linhagem selvagem, *B. subtilis* 168; vetor vazio, *B. subtilis* 168 contendo o pBs3Clux; construções do sistema de autoindução com o pBs3Clux; controle positivo com o *srfA* e o pBs3Clux (Fonte: A AUTORA, 2019). ..... 55

**Figura 21.** Força relativa do promotor das linhagens construídas para o sistema de autoindução da expressão gênica. O clone identificado como luxRI foi estabelecido arbitrariamente como de força 1 para determinação da força relativa dos outros promotores (Fonte: A AUTORA, 2019). ..... 56



<b>Figura 22.</b> Taxa de indução do promotor das linhagens construídas para o sistema de autoindução da expressão gênica (Fonte: A AUTORA, 2019). .....	58
<b>Figura 23.</b> Representação esquemática dos circuitos gênicos utilizados para o teste de fluorescência. Os plasmídeos da figura foram inseridos no cromossomo de <i>B. subtilis</i> . Em: 1. Sistema de autoindução com Plux inseridos no locus <i>amy</i> e controlando o gene repórter da <i>gfp</i> ; 2. Controle positivo com <i>Psrfa</i> inseridos no locus <i>amy</i> e controlando o gene repórter da <i>gfp</i> ; 3. Sistema de autoindução inserido no locus <i>amy</i> e Plux <i>upstream</i> ao gene da <i>gfp</i> inserido no locus <i>lacA</i> (Fonte: A AUTORA, 2019). .....	60
<b>Figura 24.</b> Avaliação da fluorescência dos <i>B. subtilis</i> 168 transformados em função do tempo e densidade celular. GFP utilizada como repórter. Cultivo realizado em leitora de microplacas TECAN. <b>A.</b> Controle negativo sem promotor. <b>B.</b> Promotor <i>srfa</i> . <b>C.</b> Sistema <i>luxRI</i> His-tag associado ao promotor Plux3.2 no mesmo locus. <b>D.</b> Sistema <i>luxRI</i> His-tag e promotor Plux3.2 em locus distintos (Fonte: A AUTORA, 2019). .....	61
<b>Figura 25.</b> Avaliação da fluorescência dos <i>B. subtilis</i> transformados em função do tempo e densidade celular. GFP utilizada como repórter. Cultivo realizado em leitora de microplacas TECAN. <i>B. subtilis</i> 168 contendo promotor <i>srfa</i> utilizado como controle positivo (azul escuro). <i>B. subtilis</i> 168 contendo <i>luxRI</i> His-tag associado ao promotor Plux 3.2 no mesmo locus (azul claro). <i>B. subtilis</i> K07 contendo <i>luxRI</i> His-tag associado ao promotor Plux 3.2 no mesmo locus (verde). O clone utilizado com o promotor <i>srfa</i> foi estabelecido arbitrariamente como de força 1 para determinação da expressão gênica relativa das linhagens comparadas (Fonte: A AUTORA, 2019). .....	63

## SUMÁRIO

---

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 Produção heteróloga de proteínas em <i>Bacillus subtilis</i> .....	18
1.2 Sistema <i>lux</i> de <i>Aliivibrio fischeri</i> .....	19
1.3 Sistema de <i>quorum-sensing</i> em <i>B. subtilis</i> .....	22
1.4 Curva de crescimento microbiano .....	22
1.5 Promotores bacterianos .....	23
1.6 Biologia sintética .....	25
1.7 Tecnologias em biologia molecular .....	25
1.8 Produção industrial de biomoléculas .....	29
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 Linhagens e condições de crescimento .....	31
3.2 Plasmídeos utilizados .....	32
3.3 Meios de cultura .....	33
3.4 Oligonucleotídeos .....	33
3.5 Clonagem gênica .....	34
3.6 Enzimas de restrição .....	34
3.7 Confirmação da clonagem e transformação .....	34
3.8 Preparação de células quimicamente competentes de <i>E. coli</i> Top 10 .....	35
3.9 Preparação de células quimicamente competentes de <i>B. subtilis</i> .....	35
3.10 Transformação em <i>E. coli</i> Top 10 .....	36
3.11 Sequenciamento de DNA .....	36
3.12 Transformação em <i>B. subtilis</i> .....	37
3.13 Ensaio de funcionalidade do sistema de autoindução (teste em mesa agitadora) .....	37
3.14 Ensaio de funcionalidade do sistema de autoindução (teste em leitora de microplacas) .....	38
3.15 Otimização dos sistemas de autoindução .....	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>40</b>
4.1 Inserção do sistema de <i>quorum-sensing</i> de <i>Aliivibrio fischeri</i> em <i>Bacillus subtilis</i> .....	40
4.2 Ensaio de funcionalidade do sistema de autoindução .....	45
4.2.1 Ensaios de funcionalidade para bioluminescência .....	46
4.3 Otimização dos sistemas de autoindução .....	49

4.3.1 Ensaio de bioluminescência .....	49
4.3.2 Ensaio de modularidade do sistema .....	59
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>
ANEXO A - Composição do Meio de cultura LB (Luria-Bertani) .....	69
ANEXO B - Composição do Meio Mínimo (MM) .....	70
ANEXO C - Composição do Meio Power (MP) (WANG, <i>et al.</i> , 2018).....	71
ANEXO D – Composição dos meios de cultura e soluções da técnica de transformação em <i>B. subtilis</i> .....	72
ANEXO E - Composição do meio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) ...	73
<b>APÊNDICE I - Partes, plasmídeos e linhagens utilizadas .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE II - Lista de primers.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Produção heteróloga de proteínas em *Bacillus subtilis*

Produção heteróloga de proteínas significa fazer com que a célula expresse proteínas, não sintetizadas anteriormente, a partir de genes de outro organismo. Além da produção dessas proteínas também é necessário torná-las funcionais.

As proteínas recombinantes podem ser produzidas por diferentes hospedeiros, tais como: células de mamíferos, leveduras, bactérias, sendo estas últimas o meio de expressão de proteínas heterólogas mais utilizado (PEREIRA, 2009).

A produção heteróloga de proteínas em *Bacillus subtilis* é interessante por muitas razões: *B. subtilis* foi uma das primeiras bactérias estudadas, chamado inicialmente de *Vibrio subtilis* em 1835 e renomeado *B. subtilis* em 1872, é um dos mais bem caracterizados organismos bacterianos; tem sua segurança comprovada, sendo classificado como GRAS (*generally recognized as safe*), de acordo com a FDA americano (*Food and Drugs Administration*); tem a capacidade de secretar grandes quantidades (gramas por litro) de proteína diretamente no meio de crescimento; são facilmente cultiváveis (NCBI, 2017; HARWOOD, 1992; WONG, 1995). Além disso, novas técnicas para padronização de partes biológicas estão sendo desenvolvidas pela biologia sintética para este microrganismo (RADECK *et al.*, 2013).

Cepas derivadas de *B. subtilis* que carregam sequências específicas no seu cromossomo para inserção de plasmídeos são coletivamente chamadas ‘BGM (*Bacillus genome*) vectors’ (ITAYA *et al.*, 2000).

Após a descoberta do *B. subtilis* 168 que exibe competência natural, essa bactéria tem sido intensamente considerada para ser um organismo modelo ideal e um hospedeiro robusto para estudar diversos mecanismos básicos, tais como metabolismo, regulação gênica, diferenciação bacteriana, e aplicação para propósitos industriais, tais como expressão de proteínas heterólogas e a superprodução de um conjunto de moléculas bioativas (CUI *et al.*, 2018).

Como uma bactéria não-patogênica e livre de endotoxina, *B. subtilis* está atraindo um grande interesse em pesquisadores que procuram explorar sua poderosa capacidade de produção e secreção de proteína, especialmente várias proteínas de alto valor agregado (CUI, *et al.*, 2018).

## 1.2 Sistema *lux* de *Aliivibrio fischeri*

Muitas bactérias desenvolveram mecanismos de controle quando em comunidades (colônias, consórcios ou biofilmes) para somente regular a expressão de genes específicos quando as densidades celulares e condições ambientais são favoráveis. Esta comunicação é chamada de *quorum-sensing* (sensor de quórum) (QS), e foi descoberta pela primeira vez na bactéria Gram negativa *Aliivibrio fischeri* (SHADEL *et al.*, 1990).

*A. fischeri* é um simbiote específico em órgãos luminescentes de certos peixes marinhos e lulas e é também encontrado de forma livre na água do mar. Essa bactéria foi isolada pela primeira vez de órgãos luminescentes da lula havaiana (*Euprymna scolopes*). No ambiente do órgão luminescente, *A. fischeri* atinge alta densidade celular ( $10^{10}$ - $10^{11}$  células por mL) e é luminescente, e em água do mar as espécies dessa bactéria são encontradas em menos de 100 células por mL. As concentrações de autoindutores não podem se acumular em densidades baixas como ocorre na água do mar, e assim *A. fischeri* não deve ser luminescente no seu estado de vida-livre. Portanto, a autoindução pode ser vista como um sistema de sinalização celular específico de espécies que permite que *A. fischeri* discrimine entre o seu estado vida-livre, baixa densidade celular, e o seu estado de alta densidade celular, associado ao hospedeiro, fornecendo assim a ativação dos genes de luminescência durante essa associação (FUQUA *et al.*, 1996).

Os genes responsáveis pela produção de bioluminescência em *A. fischeri* são compostos de dois operons, operon left ou esquerdo (OL) e operon right ou direito (OR). OL contém o gene *luxR* codificando um ativador transcricional do sistema. OR contém sete genes (*lux operon*) seguidos por um terminador transcricional (STEVENS; DOLAN; GREENBERG, 1994).

O *lux* operon contém *luxI* seguido por cinco genes que são requeridos para produção de luz (*luxABCDE*) e um gene adicional de função desconhecida (*luxG*). Os genes *luxA* e *luxB* codificam as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da luciferase. Os genes *luxC*, *luxD* e *luxE* codificam os componentes de uma redutase ácida que converte a longa cadeia de ácidos graxos do ácido tetradecanóico em um substrato aldeído de ácido graxo (tetradecanal) para a produção de luz pela enzima luciferase. O gene *luxI* codifica a enzima (autoindutor acyl-homoserine lactone synthase) que produz a molécula sinal do *quorum-sensing* 3-oxo-C6-HSL (acyl-homoserine lactone - AHL). O single gene transcrito na direção oposta, *luxR*, codifica a ativação para o sinal da transcrição do operon *luxICDABEG* (FUQUA; GREENBERG, 2002).

Quando os níveis do livremente difusível AHL atingem um limiar de concentração, esta molécula se liga ao domínio N-terminal da proteína LuxR e ativa o domínio C-terminal da proteína de ligação com a *lux box*. A *lux box* é uma região de DNA com 20 pb na região promotora do DNA e é localizada *upstream* ao sítio de início transcricional do *luxICDABEG* operon. A ligação do complexo 3-oxo-C6-HSL-LuxR a *lux box* facilita a ligação entre RNA polimerase à região promotora do *luxICDABEG*, levando à melhoria da transcrição e produção de bioluminescência (YAN *et al.*, 2007).

A ativação transcricional requer a presença de uma sequência de 20 pares de bases de repetição na *lux box* na posição centrada de 42.5 bases *upstream* do início transcricional do operon *lux* (EGLAND; GREENBERG, 2000).

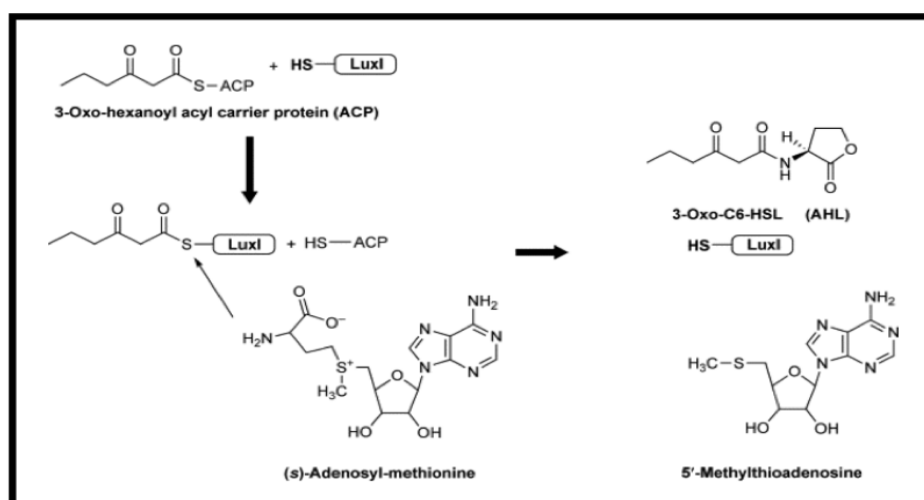
O promotor direito dá fraca expressão constitutiva dos genes *downstream*. Como LuxI (em contraste com o LuxR) é codificado no Operon *lux*, o sistema contém um feedback positivo. O operon constitutivamente produz o autoindutor em quantidades baixas. Se a célula aumenta a densidade, o loop de feedback positivo é induzido, resultando em um aumento da produção de autoindutor por célula (KUTTLER; HENSE, 2008). A regulação do operon *lux* de *A. fischeri* tem sido intensivamente estudado como um modelo para *quorum-sensing* em proteobacteria (QUIN *et al.*, 2007).

Os autoindutores são moléculas pequenas produzidas pelas células bacterianas. Estas moléculas atravessam as células, algumas por simples difusão, e se acumulam no ambiente em quantidade proporcional ao crescimento celular. Por meio do mecanismo de QS, a bactéria é capaz de detectar a concentração de autoindutores e desta maneira perceber o tamanho da população. A partir de uma determinada concentração limite dos autoindutores, estes sinais servem de co-indutores e passam a regular a transcrição de genes-alvo, sendo que os produtos de transcrição garantem, presumivelmente, alguma vantagem para a célula bacteriana (RUMJANEK *et al.*, 2004). A concentração extracelular dos autoindutores depende da densidade celular presente (KUTTLER; HENSE, 2008).

A comunicação específica em *A. fischeri* é realizada utilizando moléculas de N-acil-homoserina lactona (AHL) como mensageiras. A taxa de síntese desta molécula sinal é determinada pela atividade da enzima AHL sintetase LuxI (codificada pelo gene *luxI*). AHL difunde-se intra- e extracelularmente, tendo sua concentração diretamente correlacionada à densidade celular da cultura. Ao atingir um determinado limiar de concentração, AHL liga-se à proteína regulatória LuxR (codificada pelo gene *luxR*). O complexo LuxR-AHL induz a transcrição de *luxI* através da ligação a uma sequência específica localizada na região promotora do gene, conhecida como *lux box*. Esse processo

de indução aumenta a síntese de AHL devido à síntese de LuxI, gerando um ciclo de *feedback* positivo, que leva à ativação completa da expressão gênica. Esse processo de *quorum-sensing* é bem conhecido e bem caracterizado (FUQUA; GREENBERG, 2002; LAZDUNSKI *et al.*, 2004; COLLINS *et al.*, 2006; QIN *et al.*, 2007; CASE *et al.*, 2008), além de empregar um número relativamente reduzido de componentes, fazendo dele uma ótima escolha para a construção do sistema de autoindução da expressão gênica. A finalidade do presente trabalho é introduzir este sistema autocatalítico em *B. subtilis* e usá-lo para o desenvolvimento de linhagens que possam ser utilizadas com diversas finalidades.

O sistema *lux* regula o operon da luciferase e a produção de bioluminescência. LuxI foi isolado como uma AHL sintase e direciona a síntese de N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL). O esquema químico do 3-oxo-C6-HSL em *A. fischeri* é mostrado na Figura 1, LuxI liga um ACP (proteína carreadora de acil) acilado e S-adenosylmethionina. Então, AHL é formado com a formação do anel de lactona e liberação do 5'-methylthioadenosina. LuxI consiste de 193 aminoácidos incluindo um sítio de ativação para formação de uma ligação amida com S-adenosylmethionina. Então, AHL é formado com a formação do anel de lactona e liberação do 5'-methylthioadenosina. LuxR consiste de 250 aminoácidos e tem dois domínios. A região do N-terminal é um sítio de ligação da AHL com um motif helix-turn-helix. LuxR foi isolado como um ativador transcripcional do operon luciferase. 3-Oxo-C6-HSL sintetizado por LuxI liga-se ao LuxR e o complexo 3-oxo-C6-HSL-LuxR liga-se ao DNA na região denominada *lux box* e ativa a transcrição do operon da bioluminescência *luxICDABEG* (HORINOUCI *et al.*, 2010).



**Figura 1.** A via sintética do AHL (3-oxo-C6-HSL neste caso) (Fonte: HORINOUCI *et al.*, 2010).

A primeira AHL descrita foi a N-(B-ketocaproyl)-homoserine lactone (3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL) em *A. fischeri* (EBERHARD *et al.*, 1981). Os AHLs apresentam ação com atividades de mediadores da densidade celular da expressão gênica do QS e são amplamente variáveis em tipos e quantidades na maioria das Gram-negativas Proteobacterias. Entender a regulação dos AHLs pode contribuir para a elucidação do fenômeno da densidade celular dependente (LIU *et al.*, 2017).

### 1.3 Sistema de *quorum-sensing* em *B. subtilis*

Em *B. subtilis*, o *locus comQXPA* codifica a resposta do sistema de *quorum-sensing* típico de bactérias Gram-positivas. Ele é responsável pela transcrição de quatro proteínas, o ComQ isoprenyl transferase, o ComX pré-peptídeo sinal, o ComP histidine quinase e o regulador da resposta ComA. A resposta do *quorum-sensing* é mediada por um peptídeo de 10 aminoácidos modificado (feromônio ComX), que é modificado pelo ComQ isoprenyl transferase, que ativa um receptor histidina quinase (ComP) que ativa uma resposta de transcrição do regulador (ComA). As moléculas de sinalização e proteínas regulatórias do *quorum-sensing* são bastante diferentes entre Gram-positivas e Gram-negativas e a regulação fisiológica convergente de genes similares e processos indicam a importante e conservada natureza da resposta do quórum (COMELLA; GROSSMAN, 2005; DOGSA *et al.*, 2014). Porém, as características gerais do *locus comQXPA* são diferentes do sistema regulatório do AHL de bactérias Gram negativas e cada um apresenta sua especificidade de ativação.

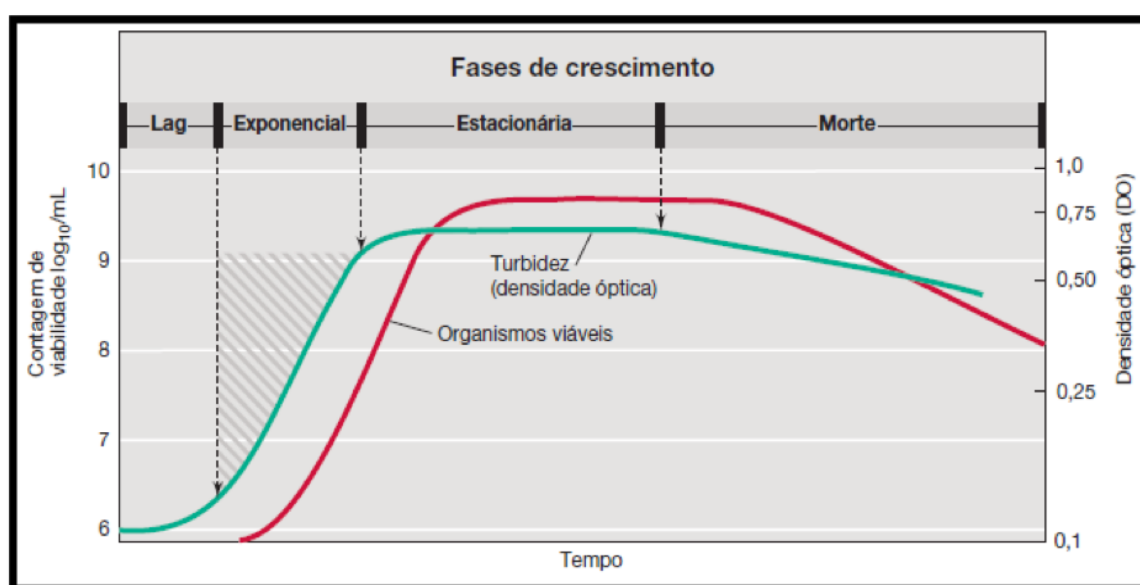
### 1.4 Curva de crescimento microbiano

A curva de crescimento microbiano em sistema descontínuo apresenta 4 fases: *lag*, exponencial, estacionária e morte celular, conforme representado na Figura 2.

A **fase lag** ocorre quando uma população microbiana é inoculada em um novo meio e o crescimento é iniciado somente após um período de tempo, também denominada fase de adaptação. Esse intervalo pode ser breve ou longo, dependendo do histórico do inóculo e das condições de crescimento. A **fase exponencial** é caracterizada pelo crescimento intenso da população microbiana. As taxas de crescimento exponencial variam amplamente, sendo influenciadas pelas condições ambientais (temperatura, composição do meio de cultura),



bem como pelas características genéticas do próprio organismo. A **fase estacionária** ocorre quando o crescimento exponencial cessa, não se observa aumento ou diminuição efetivos do número de células, algumas células da população crescem ao passo que outras morrem e os dois processos se equilibram. Isso ocorre porque um nutriente essencial é depletado ou os produtos de excreção do organismo, que podem ser tóxicos para célula, acumulam-se. A **fase de morte ou declínio celular** é quando o número de organismos que morrem torna-se progressivamente superior aos que surgem (BORZANI *et al.*, 2001; MADIGAN *et al.*, 2016).

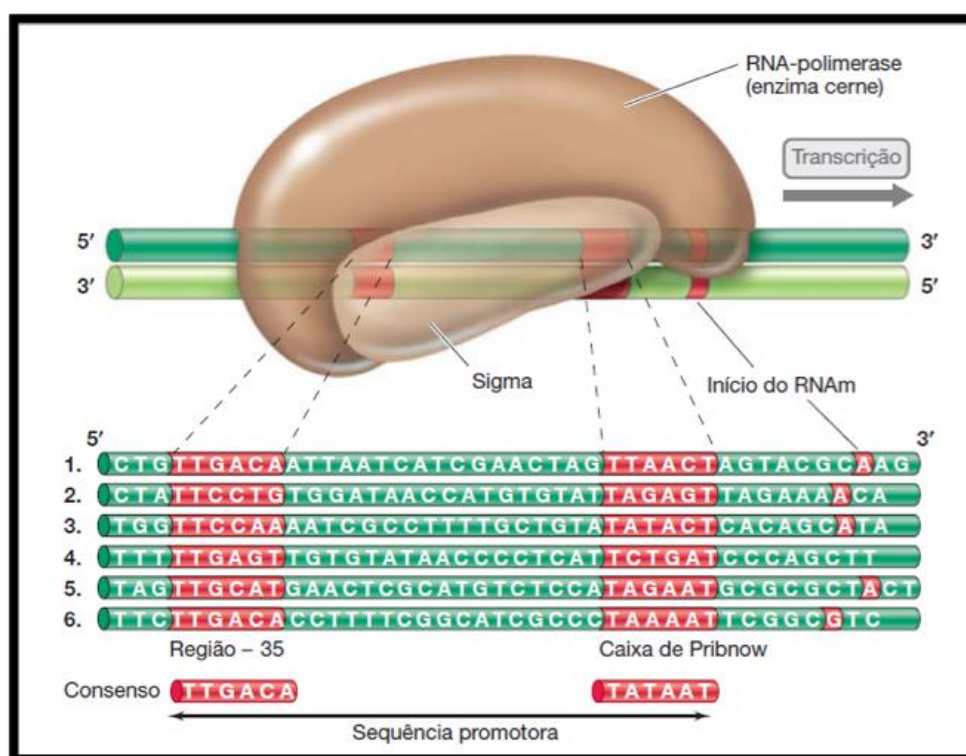


**Figura 2.** Curva de crescimento típica de uma população bacteriana em sistema descontínuo. Uma contagem de viáveis mede as células presentes na cultura capazes de se reproduzir. A densidade óptica (turbidez), uma medida quantitativa da dispersão de luz por uma cultura líquida, aumenta de acordo com o aumento do número de células (Fonte: MADIGAN *et al.*, 2016).

### 1.5 Promotores bacterianos

O promotor é a região do circuito gênico responsável pela afinidade e acoplamento da RNAPolimerase (RNAP) e estão localizados em proximidade ao sítio de inicialização da transcrição de genes (MADIGAN *et al.*, 2016). Ainda segundo Cui *et al.* (2018), um promotor é um tipo de elemento genético crucial que governa o padrão, o tempo e a força da transcrição. Promotores bacterianos são reconhecidos pela subunidade sigma da RNAP e, normalmente, apresentam entre 100-1000 pb (figura 3).

A região -35 é o principal sítio de ligação da RNA polimerase, sendo que mutações nesta sequência causam diminuição da formação do complexo RNAP-DNA. A região -10 é o sítio onde ocorre a abertura das fitas do DNA para iniciar a transcrição, e em muitos promotores apresenta uma predominância de bases A e T, facilitando a abertura das fitas por formarem apenas duas ligações de hidrogênio. O espaçamento entre duas regiões também é importante para permitir o correto posicionamento da RNAP e varia entre 16 e 19 pares de base (pb). Quanto mais próximo ao consenso ideal uma sequência regulatória estiver, mais forte será o promotor, mas deve-se ter em conta que promotores mais fracos são mais precisamente regulados quando necessário (MARQUES, 2012).



**Figura 3.** A interação da RNAP com um promotor bacteriano. Apresentadas abaixo da RNAP e do DNA encontram-se seis sequências promotoras diferentes identificadas em *Escherichia coli*. São apresentados os contatos da RNAP com a região -35 e com a caixa de Pribnow (sequência -10). A transcrição inicia-se em uma base específica, imediatamente *downstream* à caixa de Pribnow. Abaixo das sequências reais das regiões -35 e da caixa de Pribnow estão as sequências-consenso, derivadas de comparações realizadas entre muitos promotores. Observe que, embora sigma reconheça as sequências do promotor na fita 5' - 3' do DNA (em verde-escuro), a enzima cerne da RNAP transcreve, de fato, a fita em verde-claro, com sentido 3' - 5', uma vez que a enzima cerne atua apenas na direção 3' - 5' (Fonte: MADIGAN *et al.*, 2016).

## 1.6 Biologia sintética

A capacidade de projetar racionalmente microrganismos tem sido um objetivo há muito tempo imaginado que remonta há mais de meio século. Com a revolução genômica e ascensão da biologia de sistemas na década de 1990 veio o desenvolvimento de uma rigorosa disciplina de engenharia para criar, controlar e programar comportamento. O campo resultante de toda essa evolução é conhecido como biologia sintética (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014).

O objetivo primário da biologia sintética é a construção de circuitos genéticos com comportamentos que podem ser previstos com base nas propriedades das partes genéticas constituintes das quais são construídas. No entanto, uma questão significativa na construção de circuitos genéticos sintéticos é um fenômeno conhecido como dependência de contexto em que o comportamento de uma determinada parte muda dependendo da escolha de partes adjacentes ou próximas. Interações entre partes comprometem a modularidade do circuito, impedindo a implementação de construções genéticas previsíveis. Para tentar sanar esta questão, investigadores desenvolveram insuladores genéticos que impedem essas interações não intencionais dependentes do contexto entre partes vizinhas. Um dos insuladores mais comumente usados em sistemas bacterianos é a ribozima auto-clivante riboJ (CLIFTON *et al.*, 2018; LOU *et al.*, 2012).

O objetivo subjacente da biologia sintética é tornar o processo de engenharia de sistemas biológicos mais fácil. Trabalhos recentes concentraram-se em definir e desenvolver partes biológicas padrão. O padrão técnico que tem ganhado mais força na comunidade de biologia sintética é o padrão *BioBrick* para composição física de partes genéticas. Peças que estão em conformidade com o padrão de montagem da *BioBrick* são peças biológicas padrão da *BioBrick*. Essas partes são depositadas e estão disponíveis no Registro de Peças Biológicas Padrão (SHETTY *et al.*, 2008).

## 1.7 Tecnologias em biologia molecular

A engenharia de circuitos genéticos com funcionalidade preditiva em células vivas representa um foco definidor do campo em expansão da biologia sintética (DANINO *et al.*, 2010). Mas qual seria a maneira mais rápida e simples de verificar se o sistema está funcional após a inserção do circuito gênico?

As hibridizações em arranjo e os chips gênicos podem ser usados para verificar se os genes são transcritos, mas não fornecem informações sobre a tradução dos transcritos gênicos. Além disso, a complexidade e o custo de *RNA-Seq* e *microarrays* os tornam inadequados para estabelecer um modelo dinâmico de expressão gênica diferencial em alta resolução. Anticorpos são comumente utilizados para detectar os produtos proteicos dos genes de interesse. *Western blots* são usados para detectar proteínas separadas por eletroforese, e anticorpos ligados a substância fluorescentes são usados para detectar a localização das proteínas *in vivo*. No entanto, os dois métodos só propiciam a análise momentânea de uma proteína (BOTELLA *et al.*, 2012; SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

A tecnologia de fusão de promotores, no entanto, permite mudanças dinâmicas na expressão gênica a ser estabelecida em alta resolução temporal com relativa facilidade e baixo custo.

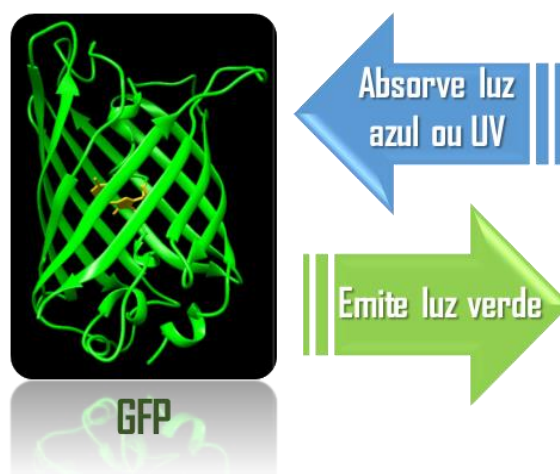
LacZ surgiu como um repórter de escolha porque a atividade da  $\beta$ -galactosidase poderia ser facilmente testada usando substratos que produzem compostos coloridos. Enquanto LacZ é um bom indicador qualitativo de expressão, a quantificação requer a coleta de células e preparação do lisado, características que requerem que o sistema biológico em estudo seja amostrado e perturbado. Isso torna-o inadequado para análise de alto rendimento e monitoramento de alta definição da expressão gênica. A desvantagem de ter que preparar lisados celulares para quantificar os níveis de LacZ foi superado usando GFP (codificada pelo gene *gfp*) e luciferase (codificada pelos genes *lux*) cujos níveis intracelulares podem ser medidos em tempo real sem perturbar as células em estudo (BOTELLA *et al.*, 2012).

A proteína verde fluorescente (GFP) da água-viva *Aequorea victoria* é um instrumento eficiente que pode ser usado no estudo da expressão gênica no nível de proteínas. Atualmente, a GFP é usada para monitorar a síntese e a localização de proteínas específicas em grande variedade de células vivas. Esses estudos implicam a construção de genes de fusão que contenham a sequência nucleotídica codificadora de GFP, acoplados em estrutura à sequência nucleotídica codificadora da proteína de interesse; a introdução do gene quimérico nas células por transformação; e estudo da fluorescência da proteína de fusão em células transgênicas expostas à luz azul ou ultravioleta (UV) (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

GFP é uma variante de dobra rápida (*superfolding*) que é extraordinariamente estável em *Escherichia coli* e *B. subtilis* com meia-vida estimada de mais de 24 horas e

aproximadamente 10 horas, respectivamente (ANDERSEN *et al.*, 1998; BOTELLA *et al.*, 2011).

O fluoróforo de GFP é produzido pela ciclização e oxidação pós-tradução de um tripeptídeo serina/tirosina/glicina codificado. Esse cromóforo é amplamente protegido dos efeitos de íons e solventes graças ao encerramento em uma prega, semelhante a um barril, da proteína madura. Ao contrário de outras proteínas bioluminescentes, a fluorescência de GFP não requer a adição de substratos, cofatores ou outras substâncias, basta a exposição à luz azul ou UV (figura 4). Assim, GFP pode ser usada para estudar a expressão gênica em células vivas, a localização e o movimento de proteínas nas células com o passar do tempo (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

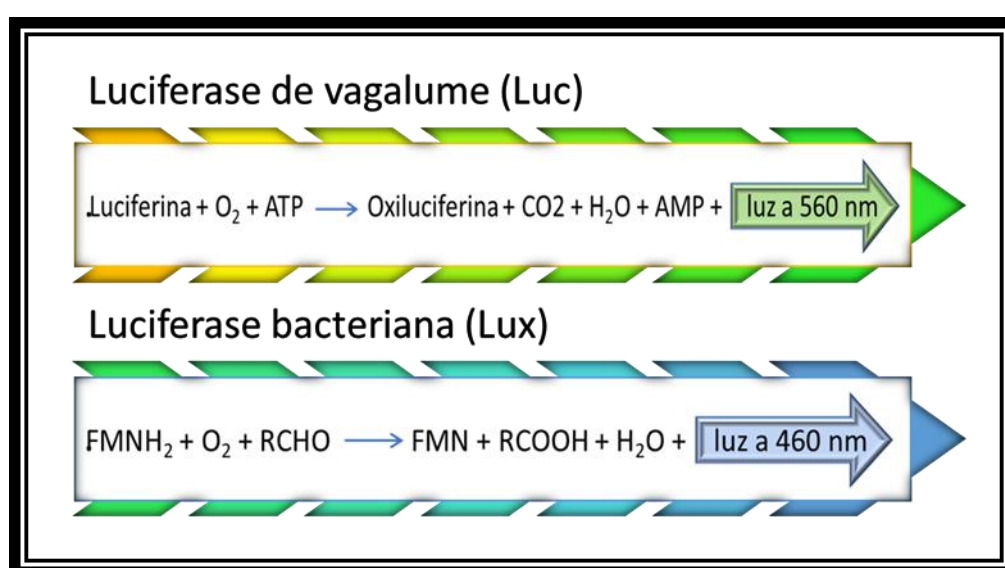


**Figura 4.** Estrutura estável da proteína verde fluorescente GFP. A seta azul indica absorção de luz azul ou ultravioleta e a seta verde emissão de luz verde (Fonte: Adaptado de: <https://pt.slideshare.net/TBQ-RLORC/green-fluorescent-protein-gfp/6>, 2019).

As luciferases configuram uma classe de enzimas oxidativas que catalizam a emissão de luz (luminescência). Quando a reação ocorre em um organismo é chamada bioluminescência. A bioluminescência evoluiu independentemente; assim, os genes responsáveis não estão relacionados em bactérias, algas unicelulares, celenterados, besouros, peixes e outros. Quimicamente, todos envolvem reações exergônicas de oxigênio molecular com diferentes substratos (luciferinas) e enzimas (luciferases), resultando em fótons de luz visível (WILSON; HASTINGS, 1998).

Dois tipos da proteína luciferase são comumente utilizados, do vagalume da América do Norte (*Protinus pyralis*) e o bacteriano, derivado de microrganismos marinhos

(*Photobacterium phosphoreum*, *P. leiognathi*, *V. harveyi*, *A. fischeri* e *P. luminescens*). A luciferase do vagalume utiliza a luciferina como substrato, oxidando-a em oxiluciferina numa reação que utiliza oxigênio molecular e ATP, e libera luz a 560 nm. A luciferase bacteriana é codificada pelo operon *luxCDABE* e catalisa a oxidação de uma flavina reduzida (FMNH<sub>2</sub>) e uma longa cadeia de aldeído, produzindo flavina oxidada e mononucleotídeo de flavina (FMN) e uma longa cadeia de ácido graxo, uma reação que libera a luz a 490 nm (ENGBRECHT; SILVERMAN, 1984; WILSON; HASTINGS, 1998; WAIDMANN *et al.*, 2011) (figura 5).



**Figura 5.** Reações químicas exergônicas da luciferase de vagalume e a bacteriana com liberação de fótons de luz (Fonte: Adaptado de: HYONE-MYONG EUN, 1996).

O operon da luminescência já foi clonado em outros Gram negativos. *E. coli* recombinantes que produzem luz foram encontradas em uma biblioteca clonal de plasmídeos híbridos contendo DNA da bactéria marinha *A. fischeri*. Todos os clones luminescentes tinham uma inserção de 16 kb que codificava atividades enzimáticas para a reação de luz, bem como funções regulatórias necessárias para a expressão do fenótipo de luminescência (Lux) (ENGBRECHT; NEALSON; SILVERMAN, 1983; DUNLAP; GREENBERG, 1985).

De uma forma geral, a funcionalidade do sistema pode ser detectada indiretamente pela tradução dos transcritos gênicos com a adição de genes repórteres. Estes podem ser utilizados para monitorar a frequência de expressão de um determinado gene controlado por sequências regulatórias definidas (SNUSTAD; SIMMONS, 2013; ALBERTS *et al.*,

2017). Para isso, criamos variáveis do nosso sistema acoplando os genes da luminescência (*luxABCDE*) ou da proteína verde fluorescente GFP (*gfp*).

### **1.8 Produção industrial de biomoléculas**

Nas últimas décadas os processos químicos de produção industrial têm sido repensados e, em muitos casos com sucesso, substituídos por processos biológicos. A pressão para a mudança vem de vários lados e se baseia principalmente na maior eficiência de conversão nas reações biologicamente catalisadas, na redução dos resíduos tóxicos gerados no processo produtivo e no esgotamento de fontes naturais de algumas matérias primas utilizadas nos processos químicos. As descobertas, primeiro das técnicas de biologia molecular e mais recentemente de biologia sintética, têm proporcionado, cada vez mais, variadas possibilidades de desenvolvimento racional de processos biológicos mais eficientes para atender as demandas industriais.

Os novos conceitos desenvolvidos pela biologia sintética mostram que a pesquisa por novos produtos, novas vias de produção e por novas funções não precisa se restringir ao lento processo de seleção de organismos com propriedades interessantes. Cada vez mais se torna real a ideia da construção de células como biofábricas, bioprocessadores e biossensores capazes de desempenhar funções complexas para as quais foram programados.

Linhagens bacterianas modificadas geneticamente para a produção industrial de biomoléculas são comumente construídas usando-se promotores constitutivos para controlar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese da molécula em questão. Promotores induzíveis não são desejados em linhagens industriais devido aos custos associados à adição do composto indutor e posterior eliminação do mesmo no processo de purificação da biomolécula de interesse. Porém, o atual modelo, empregando promotores constitutivos, força a célula a sintetizar intensamente a biomolécula desejada durante todas as fases do crescimento celular. A fase *lag* de crescimento é especialmente prejudicada por esse sistema, o stress causado pela intensa expressão de genes sob controle do promotor forte leva ao prolongamento excessivo dessa fase do crescimento celular e à redução da capacidade de crescimento da cultura, retardando todo o processo produtivo. Na construção da linhagem industrial de *B. subtilis* superprodutora de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), por exemplo, o fraco promotor constitutivo *Prib* foi substituído pelo forte promotor *Pveg* (ABBAS; SIBIRNY, 2011) gerando uma linhagem que, apesar da aumentada produção de riboflavina, é instável e apresenta crescimento limitado (figura 6).





**Figura 6.** Cultivo de *B. subtilis* em placa de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani) acrescido de ágar. À esquerda, *B. subtilis* Marburg 168 (tipo selvagem); à direita, linhagem industrial de *B. subtilis* superprodutora de riboflavina. Apesar dos dois cultivos terem sido incubados pelo mesmo período e temperatura (16h a 37 °C), a linhagem industrial apresentou crescimento visivelmente inferior ao tipo selvagem, devido ao stress gerado pela produção de riboflavina em grande quantidade desde a fase *lag* de crescimento (Fonte: cultivo e foto de Danielle B. Pedrolli, 2016).

Neste trabalho, propõe-se a construção de um sistema de autoindução da expressão gênica para ser aplicado em linhagens industriais de *B. subtilis*. O sistema se baseará no processo de comunicação entre células denominado *quorum-sensing*. O sistema de *quorum-sensing* desempenha um papel importante no controle de uma variedade de atividades celulares microbianas e seus componentes têm características atraentes de design para geração, reconhecimento e amplificação de sinal difusível, que podem ser aplicados em uma ampla variedade de sistemas modificados geneticamente. Os mesmos têm sido utilizados na construção de diversos modelos pela biologia sintética, em especial no desenvolvimento de biossensores (CHOUDHARY; SCHMIDT-DANNERT, 2010).

O sistema de indução visa preservar o equilíbrio metabólico natural da bactéria durante a fase *lag* e início da fase exponencial, mantendo o crescimento rápido, preparando o ambiente celular para a intensa expressão gênica que virá a seguir e deverá permitir a realização de automonitoramento pela bactéria. A autoindução eliminará os custos da produção industrial com a adição de substâncias indutoras como o isopropil  $\beta$ -D-1-



tiogalactopiranosideo (IPTG) e posterior retirada delas no processo de purificação. Além disso, eliminará a necessidade de monitoramento da densidade celular anteriormente à indução, pois a própria bactéria se encarregará dessa tarefa. O novo conceito é amplamente aplicável, podendo ser posteriormente adaptado a outras espécies, e com potencial a ser um elemento inovador no portfólio da moderna biologia sintética.

## 5 CONCLUSÕES

---

O sistema de autoindução do *A. fischeri* foi transferido para *B. subtilis* e mostrou-se adequadamente funcional, ativando a expressão gênica somente durante a fase exponencial do crescimento bacteriano.

O processo de otimização foi bem-sucedido e variações do sistema foram obtidas quanto à amplitude de ativação e a força do promotor, permitindo a sua utilização para diferentes finalidades.

Ao testar o sistema, com variações dos genes reporters e separação do sistema, eles continuaram funcionais, modulares e específicos, como esperado numa ferramenta proveniente da biologia sintética.

Esse *toolbox* de autoindução pode ser aplicado em engenharia metabólica, com a escolha do promotor mais adequado dependendo da necessidade de cada enzima de uma via, por exemplo. Sua utilização pode reduzir os custos do processo produtivo, sem a necessidade de adição de indutores durante o processo e retirada durante purificação do produto final, além de melhorar o crescimento das linhagens produtoras, sem a interferência brusca na fase *lag* como ocorre com os promotores constitutivos.

## REFERÊNCIAS

---

- ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 2, p. 321-360, 2011.
- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia molecular da célula*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1426p.
- ANDERSEN, J. B. O.; STERNBERG, C.; POULSEN, L. K.; BJØRN, S. P.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 6, p. 2240-2246, 1998.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biocologia Industrial*. São Paulo: Blücher, 2001. v. 1, 254p.
- BOTELLA, E.; NOONE, D.; SALZBERG, L. I.; HOKAMP, K.; DEVINE, S. K.; FOGG, M.; WILKINSON, A. J.; DEVINE, K. M. High-resolution temporal analysis of global promoter activity in *Bacillus subtilis*. *Methods in Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 1-26, 2012.
- CAMERON, D. E.; BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. A brief history of synthetic biology. *Nature Publishing Group*, v. 12, n. 5, p. 381-390, 2014.
- CARTER, K. K.; VALDES, J. J.; BENTLEY, W. E. Pathway engineering via quorum sensing and sRNA riboregulators - Interconnected networks and controllers. *Metabolic Engineering*, v. 14, n. 3, p. 281-288, 2012.
- CASE, R. J.; LABBATE, M.; KJELLEBERG, S. AHL-driven *quorum-sensing* circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *The ISME Journal*, v. 2, p. 345-349, 2008.
- CHOUDHARY, S.; SCHMIDT-DANNERT, C. Applications of *quorum sensing* in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, p. 1267-1279, 2010.
- CLIFTON, K. P.; JONES, E. M.; PAUDEL, S.; MARKEN, J. P.; MONETTE, C. E.; HALLERAN, A. D.; EPP, L.; SAHA, M. S. The genetic insulator RiboJ increases expression of insulated genes. *Journal of Biological Engineering*, v. 12, n. 23, p. 1-6, 2018.
- COLLINS, C. H.; LEADBETTER, J. R.; ARNOLD, F. H. Dual selection enhances the signaling specificity of a variant of the *quorum-sensing* transcriptional activator LuxR. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 6, p. 708-712, 2006.
- COMELLA, N.; GROSSMAN, A. D. Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: Characterization of genes controlled by the *quorum-sensing* transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 1159-1174, 2005.

CUI, W.; HAN, L.; SUO, F.; LIU, Z.; ZHOU, L.; ZHOU, Z. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 145, p. 1-19, 2018.

DANINO, T.; MONDRAGÓN-PALOMINO, O.; TSIMRING, L.; HASTY, J. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, v. 463, n. 7279, p. 326-330, 2010.

DOGSA, I.; CHOUDHARY, K. S.; MARSETIC, Z.; HUDAIBERDIEV, S.; VERA, R.; PONGOR, S.; MANDIC-MULEC, I. ComQXPA *quorum sensing* systems may not be unique to *Bacillus subtilis*: A census in prokaryotic genomes. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. 1-8, 2014.

DUNLAP, P. V.; GREENBERG, E. P. Control of *Vibrio fischeri* luminescence gene expression in *Escherichia coli* by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein, *Journal of bacteriology*, v. 164, n. 1, p. 45-50, 1985.

EBERHARD, A.; BURLINGAME, A. L.; EBERHARD, C.; KENYON, G. L.; NEALSON, K. H.; OPPENHEIMER, N. J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase, *Biochemistry*, V. 20, n. 9, p. 2444-2449, 1981.

EGLAND, K. A.; GREENBERG, E. P. Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a Repressor, *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 3, p. 805-811, 2000.

ENGEBRECHT, J.; NELSON, K.; SILVERMAN, M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*, v. 32, n. 3, p. 773-781, 1983.

ENGEBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence, v. 81, p. 4154-4158, 1984.

FREE VECTORS ICONS. [Internet] Disponível em: <<https://www.flaticon.com/>>. Acesso em: 02 nov. 2018.

FUQUA, C.; GREENBERG, E. P. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, v. 3, n. 9, p. 685-695, 2002.

FUQUA, C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of *quorum-sensing* transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 727-751, 1996.

GUAN, C.; CUI, W.; CHENG, J.; ZHOU, L.; LIU, Z.; ZHOU, Z. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, v. 15, Article ID 66, p. 1-12, 2016.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Microbiology*, v.10, p. 247-256, 1992.

HORINOUCI, T.; YOSHIKAWA, K.; KAWAIDE, R.; FURUSAWA, C.; NAKAO, Y.; HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Genome-wide expression analysis of *Saccharomyces pastorianus* orthologous genes using oligonucleotide microarrays. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, n. 5, p. 602-7, 2010.

HYONE-MYONG EUN. Enzymology primer for recombinant DNA technology. Elsevier, 1996. 702p.

ITAYA, M.; KANEKO, S. Integration of stable extracellular DNA released from *Escherichia coli* into the *Bacillus subtilis* genome vector by culture mix method. *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. 8, p. 2551–2557, 2010.

ITAYA, M.; NAGATA, T.; SHIROISHV, T.; FUJITA, K.; TSUGE, K. Efficient cloning and engineering of giant DNAs in a novel *Bacillus subtilis* genome vector. *International Journal of Biochemistry*, v. 128, n. 5, p. 869–875, 2000.

KIM, E.; MIN, H.; TIAN, T.; YILMAZ, S.; JAVIDPOUR, P. Autonomous control of metabolic state by a *quorum sensing* (QS) - mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*. *Metabolic Engineering*, v. 44, p. 325–336, 2017.

KUTTLER, C.; HENSE, B. A. Interplay of two *quorum sensing* regulation systems of *Vibrio fischeri*. *Journal of Theoretical Biology*, v. 251, n.1, p. 167–180, 2008.

LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I.; STURGIS, J. N. Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. *Nature reviews, Microbiology*, v. 2, n. 7, p. 581–592, 2004.

LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J.; LIU, L. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 1, p. 20–30, 2017.

LOU, C.; STANTON, B.; CHEN, Y-J. Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context. *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 1137-1142, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1160 p.

MARQUES, M. V. *Biologia molecular e genética bacteriana*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 348 p.

MIJAKOVIC, I.; PETRANOVIC, D.; JENSEN, P. R. Tunable promoters in systems biology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, n. 3, p. 329-335, 2005.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. [Internet] Genome: *Bacillus subtilis* subsp. *subtillis* str. 168. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bacillus%20subtilis\[Organism\]&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bacillus%20subtilis[Organism]&cmd=DetailsSearch)>. Acesso em: 06 nov. 2017.

PEREIRA, L. M. *Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante*. Dissertação (Mestrado em Ciências: Tecnologia Nuclear-aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

QIN N.; CALLAHAN S. M.; DUNLAP, P. V.; STEVENS, A. M. Analysis of LuxR regulon gene expression during *quorum sensing* in *Vibrio fischeri*. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 11, p. 4127–4134, 2007.

RADECK, J.; KRAFT, K.; BARTELS, J.; CIKOVIC, T.; DÜRR, F.; EMENEGGER, J.; KELTERBORN, S.; SAUER, C.; FRITZ, G.; GEBHARD, S.; MASCHER, T. The *Bacillus BioBrick* Box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Engineering*, v. 7, n. 29, p. 1-16, 2013.

RUMJANEK, N. G; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. *Revista Biotecnologia Ciência Desenvolvimento*, Brasília, v. 33, p. 35-50, 2004.

SHADEL, G. S.; DEVINE, J. H.; BALDWIN, T. O. Control of the *lux* regulon of *Vibrio fischeri*. *Journal of Bioluminescence Chemiluminescence*, v. 5, p. 99-106, 1990.

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

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. *Fundamentos de genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. v. 6, 739p.

STEVENS, A. N. N. M.; DOLAN, K. M.; GREENBERG, E. P. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 91, p. 12619–12623, 1994.

WAIDMANN, M. S.; BLEICHRODT, F. S.; LASLO, T.; RIEDEL, C. U. Bacterial luciferase reporters: the swiss army knife of molecular biology. *Bioengineered Bugs*, v. 2, n. 1, p. 8–16, 2011.

WANG, Q.; YU, H.; WANG, M.; YANG, H.; SHEN, Z. Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression. *Process Biochemistry*, v. 70, p. 36–44, 2018.

WILSON, T.; HASTINGS, J. W. Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 14, p. 197–230, 1998.

WONG, S. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 6, p. 517-522, 1995.

YAN, L.; ALLEN, M. S.; SIMPSON, M. L.; SAYLER, G. S.; COX, C. D. Direct quantification of N-(3-oxo-hexanoyl)-l-homoserine lactone in culture supernatant using a whole-cell bioreporter. *Journal of Microbiological Methods*, v. 68, n. 1, p. 40–45, 2007.

