

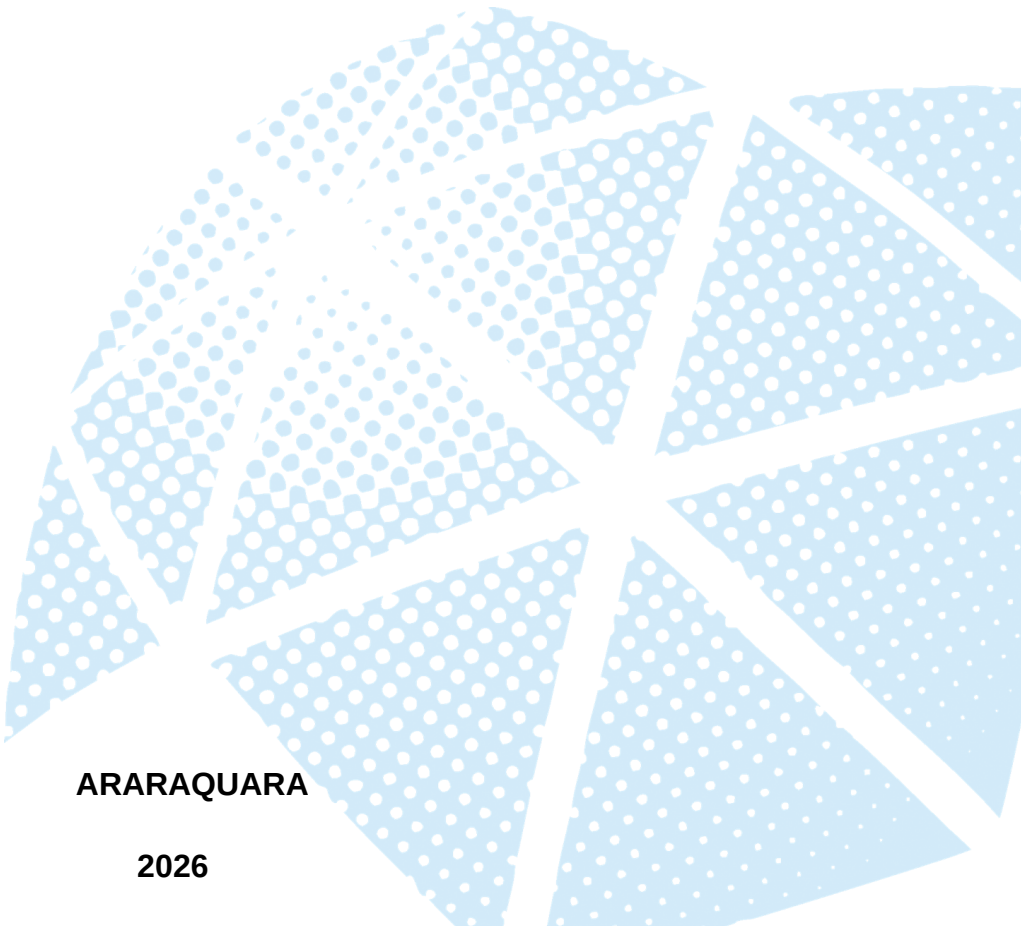
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

GABRIELA BARBOSA DE PAIVA

Desenvolvimento de um sistema de liberação de proteínas por *Bacillus subtilis*

ARARAQUARA

2026



GABRIELA BARBOSA DE PAIVA

Desenvolvimento de um sistema de liberação de proteínas por *Bacillus subtilis*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara

2026

P149d Paiva, Gabriela Barbosa de
Desenvolvimento de um sistema de liberação de
proteínas por *Bacillus subtilis* / Gabriela Barbosa de
Paiva. -- Araraquara, 2026
109 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Araraquara
Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli

1. Lise Programada. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Circuito
gênico. 4. Regulação gênica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este trabalho tem como objetivo a redução de custos relacionados à produção e purificação de biomoléculas. Entre essas biomoléculas destacam-se os biofármacos, que desempenham papel fundamental no tratamento de diversas doenças. Entretanto, o processo de purificação destes compostos é bastante custoso, uma vez que estes produtos requerem elevados padrões de pureza para garantir sua segurança e eficácia em aplicações terapêuticas humanas. Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias capazes de tornar os processos produtivos e de purificação mais eficientes e economicamente viáveis pode resultar na diminuição dos custos finais desses biofármacos, ampliando seu acesso a uma parcela maior da população.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This work aims to reduce the costs associated with the production and purification of biomolecules. Among these biomolecules, biopharmaceuticals play a fundamental role in the treatment of a wide range of diseases. However, the purification of these compounds is highly costly, as they require stringent purity standards to ensure their safety and efficacy for therapeutic applications in humans. In this context, the development of strategies capable of improving the efficiency and economic viability of production and purification processes may lead to a reduction in the final costs of these biopharmaceuticals, thereby increasing their accessibility to a larger proportion of the population.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento de um sistema de liberação de proteínas por *Bacillus subtilis*

AUTORA: GABRIELA BARBOSA DE PAIVA

ORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. DANIELLE BISCARO PEDROLI (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC (UFABC)

Prof. Dr. MARCELO MULLER DOS SANTOS (Participação Virtual)
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. DOUGLAS MORAES MENDEL SOARES (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Campus de Araraquara da Unesp

Dedico este trabalho aos meus pais Heloisa e Ovídio

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, em especial aos meus pais que se sacrificaram para fornecer uma educação de qualidade excelente para as filhas e nos ensinaram a sempre valorizar o estudo. Também gostaria de agradecer a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Danielle Pedrolli que me ensinou o tudo que eu sei sobre Biologia Sintética e sobre como fazer pesquisa. Acompanho a Dani desde a minha Iniciação Científica e nada disso seria possível sem a sua orientação.

Agradeço ao grupo de pesquisa SynBio-Araraquara e à Universidade Estadual Paulista. Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) a qual financiou o meu doutorado (Processo 2021/01284-9), tornando todo este trabalho possível. Além disso, a FAPESP financiou minha participação em eventos científicos que me possibilitaram conhecer outros trabalhos, além de divulgar o meu próprio.

Com isso, agradeço a todos que me auxiliaram no desenvolvimento deste doutorado, seja de forma direta ou indiretamente. Agradeço à Laura e a Vitória por sempre estarem do meu lado e me apoiarem durante este período; agradeço à minha irmã, Júlia, por sempre estar presente na minha vida mesmo estando longe. Este trabalho não seria possível sem o apoio das pessoas com quem eu convivo.

CAPES

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

FAPESP

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2021/01284-9.

RESUMO

A produção de biofármacos tem crescido rapidamente em todo o mundo, porém o processo de produção e purificação destas biomoléculas ainda demanda grande investimento financeiro. Uma solução para a redução destes custos consiste no desenvolvimento de uma linhagem produtora que gere altos rendimentos de produção e facilite a extração deste produto através da liberação da molécula-alvo para o meio extracelular. Com isso, neste trabalho, foi proposto o desenvolvimento de um Sistema de Lise Programada para produção e liberação de proteínas por *Bacillus subtilis*. Este sistema permitirá que a bactéria se rompa após produzir elevadas quantidades da proteína de interesse, eliminando assim a etapa de rompimento celular para a extração do produto. Foram desenvolvidas diferentes versões deste sistema utilizando a Proteína Verde Fluorescente como repórter. As diferenças entre estas versões consistem na regulação dos genes que compõem o sistema. Foram testados diferentes promotores e diferentes forças para o Sítio de Ligação do Ribossomo. Além disso, foi testada a regulação do sistema com base na Repressão Catabólica por Carbono e com base no Sistema de Quórum Sensing. Em todas as variações o sistema foi ativado, porém a versão do Sistema de Lise Programada que gerou o fenótipo de lise foi a versão responsiva à Repressão Catabólica por Carbono, em que os promotores que controlavam a expressão dos genes que constituem o sistema foram os promotores fortes para *B. subtilis* TP2 e P_{veg}. Com isso, neste trabalho foi possível desenvolver um Sistema de Lise Programada em *B. subtilis* o qual gerou a lise celular após a proteína repórter ser acumulada pela bactéria.

Palavras-chave: lise programada; *Bacillus subtilis*; circuito gênico; regulação gênica

ABSTRACT

The production of biopharmaceuticals has been rapidly increasing worldwide; however, the processes of production and purification of these biomolecules still require large financial investments. A solution to reduce such costs involves the development of a producer strain capable of achieving high yields and facilitating product recovery by releasing the target molecule into the extracellular medium. In this context, the present work proposed the development of a Programmed Lysis System for the production and release of proteins by *Bacillus subtilis*. This system enables the bacterium to undergo self-lysis after producing large amounts of the protein of interest, thereby eliminating the need for a cell disruption step during product extraction. Different versions of the system were developed using the Green Fluorescent Protein as a reporter. The main differences among these versions relied on the regulation of the genes composing the system. Various promoters and ribosome binding site strengths were tested. Additionally, the regulation of the system was assessed based on Carbon Catabolite Repression and Quorum Sensing processes. In all versions, the system was activated; however, the Programmed Lysis System variant that effectively generated the lysis phenotype was the one responsive to the Carbon Catabolite Repression, in which the strong promoters TP2 and P_{veg} were used. Therefore, in this study, it was possible to develop a Programmed Lysis System in *B. subtilis*, which successfully induced cell lysis after the accumulation of the reporter protein by the bacterium.

Keywords: programmed lysis; *Bacillus subtilis*; gene circuit; gene regulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de Repressão Catabólica por Carbono em <i>B. subtilis</i> ..	18
Figura 2 - Mecanismo de ação da Serina Integrase.	20
Figura 3 - Sistema Quórum Sensing ComQXPA de <i>B. subtilis</i> .	22
Figura 4 - Mapa do plasmídeo pBS1C.	34
Figura 5 - Mapa do plasmídeo pBS2E.	34
Figura 6 - Sistema de lise programada responsivo a Repressão Catabólica por Carbono.	49
Figura 7 - Sistema de lise programada responsivo ao Quórum Sensing.	50
Figura 8 - Clonagem do Operon14-15 no pBS2E.	51
Figura 9 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E-SP133-Operon14-15 e a resultante do sequenciamento.	52
Figura 10 - Clonagem do gene que codifica a Integrase 13 no pBS1C.	53
Figura 11 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C-SP130-INT13 e a resultante do processo de clonagem em <i>E. coli</i> TOP10.	54
Figura 12 - Clonagem do gene repórter da sfGFP.	55
Figura 13 - Colônias de <i>B. subtilis</i> KO7 transformadas pelo plasmídeo pBS1C- SP130-INT13-sfGFP.	56
Figura 14 - Cultivo das linhagens SLPI(-) e SLP(-) em LB.	57
Figura 15 - Cultivo das linhagens SLPI(-) e SLP(-) em MP.	59
Figura 16 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA das linhagens <i>B. subtilis</i> SLPI(-) e SLP(-).	60
Figura 17 - Construção dos plasmídeos pBS2E-P _{veg} -Operon14-15 e pBS1C-TP2-INT13-sfGFP.	62
Figura 18 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C-TP2-INT13-sfGFP e a resultante do processo de clonagem.	62
Figura 19 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E-P _{veg} -Operon14-15 e a resultante do processo de clonagem.	63
Figura 20 - Cultivo das linhagens SLPI(+).TP2 e SLP(+).TP2 em LB.	65
Figura 21 - Cultivo das linhagens SLPI(+).TP2 e SLP(+).TP2 em MP.	66
Figura 22 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+).TP2 e SLP(+).TP2.	67
Figura 23 - Sequenciamento entre a sequência esperada para o Operon14-15 que teve seu sentido flipado e a PCR do DNA genômico extraído da linhagem que contém o SLP completo.	69

Figura 24 - Alinhamento entre a sequência do e a resultante do processo de clonagem.	70
Figura 25 - Cultivo das linhagens SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). P_{srfA} em MP.	71
Figura 26 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). P_{srfA} .	72
Figura 27 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E- P_{veg} -Operon14-15 e a resultante do processo de mutação sítio-dirigida.	74
Figura 28 - Digestão do plasmídeo pBS2E-P-Operon14-15_mutação15 com as enzimas <i>XbaI</i> e <i>SpeI</i> .	74
Figura 29 - Cultivo das linhagens SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). P_{srfA} _mutação15 em MP.	76
Figura 30 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). P_{srfA} _mutação15.	77
Figura 31 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 em MP.	78
Figura 32 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15.	79
Figura 33 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP.	80
Figura 34 - Concentração de glicose (g/L) ao longo do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP.	81
Figura 35 - PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1).	82
Figura 36 - Digestão para testar a clonagem no Operon14-15 que contém a mutação 14+15.	83
Figura 37 - Alinhamento entre a sequência fornecida pelo sequenciamento e o pBS2E- P_{veg} -Operon14-15 para verificar a mutação14+15.	84
Figura 38 - PCR do gDNA de <i>B. subtilis</i> transformadas pelo pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação14+15.	85
Figura 39 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação14+15 em MP.	86
Figura 40 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação14+15.	87
Figura 41 - Densidade ótica de SLP(+).TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) durante o cultivo no Pioreactor.	88
Figura 42 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP no Pioreactor.	89
Figura 43 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 – cultivo em Pioreactor.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes das Reações em Cadeia da Polimerase para TIME HIFI DNA Polimerase e Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase.....	26
Tabela 2 - Componentes das Reações em Cadeia da Polimerase para Easy Taq DNA Polimerase.	27
Tabela 3 - Programa no termociclador aplicado para as enzimas TIME HIFI DNA Polimerase e Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase.....	27
Tabela 4 - Programa no termociclador aplicado para as enzimas Easy Taq DNA Polymerase.	28
Tabela 5 - Componentes das reações de digestão por enzimas de restrição..	29

LISTA DE SÍMBOLOS

GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Par de bases
Kb	Kilobase
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
LB	Luria-Bertani
SOC	Meio de cultura líquido Super optimal suplementado com glicose
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
BSA	Albumina de Soro Bovino
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de Amônio
K₂HPO₄·3H₂O	Fosfato de Potássio Dibásico Trihidratado
KH₂PO₄	Fosfato Monopotássico
MgSO₄·3H₂O	Sulfato de Magnésio Trihidratado
EGTA	Ácido Egtazico
OD_{600nm}	Densidade Óptica a 600nm
SLP	Sistema de Lise Programada
SLPI	Sistema de Lise Programada Incompleto

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1. <i>Bacillus subtilis</i> como chassis para produção de proteínas recombinantes.....	16
1.2. Repressão Catabólica por Carbono.....	17
1.3. Serina Integrases.....	19
1.4. Quórum Sensing em <i>B. subtilis</i>	21
1.5. Holina e Peptidoglicano Hidrolase, enzimas que promovem a lise celular.....	23
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivos Específicos.....	24
3. Materiais e Métodos.....	25
3.1. Materiais e Equipamentos.....	25
3.2. Métodos de clonagem e transformação bacteriana.....	26
3.2.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	26
3.2.2. Digestão por enzimas de restrição.....	28
3.2.3. Ligação de sequências de DNA pela T4 DNA Ligase.....	30
3.2.4. Produção de células de <i>Escherichia coli</i> quimicamente competentes.....	30
3.2.5. Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	30
3.2.6. Produção de <i>B. subtilis</i> competente.....	31
3.2.7. Transformação de <i>B. subtilis</i>	32
3.3. Quantificação de Açúcares Redutores.....	32
3.4. Sistema de Lise Programada.....	33
3.4.1. Sistema de Lise Programada com Promotores Fracos responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(-).....	35
3.4.1.1. Construção do plasmídeo que contém o Operon14-15 sob controle do	

promotor fraco SP133 (pBS2E-SP133-Operon14-15).....	35
3.4.1.2. Construção do plasmídeo que contém o gene que codifica a Integrase 13 sob controle do promotor fraco SP130 (pBSIC-SP130-INT13)	36
3.4.2. Construção do plasmídeo contendo o gene repórter	37
3.4.3. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(+).TP2.....	38
3.4.3.1. Construção do plasmídeo que contém o Operon14-15 sob controle do promotor forte P_{veg} (pBS2E- P_{veg} -Operon14-15).....	38
3.4.3.2. Construção do plasmídeo que contém o gene que codifica a Integrase 13 sob controle do promotor forte TP2 (pBS1C-TP2-INT13-sfGFP).....	39
3.4.4. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes induzido por Quórum Sensing – SLP(+). P_{srfA}	39
3.4.4.1. Construção do pBS1C- P_{srfA} -INT13-sfGFP	40
3.4.5. Predição das taxas de tradução dos genes que compõem o Sistema de Lise Programada.....	40
3.4.6. Construção dos plasmídeos contendo as mutações nas sequências 5'-UTR dos genes 14 e 15.....	41
3.4.6.1. Construção do plasmídeo contendo apenas a deleção dos nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15 (pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação15)	41
3.4.6.2. Construção do plasmídeo contendo as deleções dos nucleotídeos próximos aos RBSs dos genes 14 e 15 (pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação 14+15)	42
3.4.7. Validação dos Sistemas de Lise Programada.....	43
3.4.7.1. Sistema de Lise Programada responsivo a Repressão Catabólica por Carbono.....	43
3.4.7.2. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes induzido por Quórum Sensing – SLP(+). P_{srfA}	45
3.4.8. Cultivo em Pioreactor	46
3.4.9. Análise Estatística.....	47
4. Resultados.....	48

4.1.	Sistema de Lise Programada com Promotores Fracos responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(-)	50
4.1.1.	Construção do plasmídeo que contém o Operon14-15 sob controle do promotor fraco SP133 (pBS2E-SP133-Operon14-15).....	51
4.1.2.	Construção do plasmídeo que contém o gene que codifica a Integrase 13 sob controle do promotor fraco SP130 (pBSIC-SP130-INT13)	52
4.1.3.	Construção do plasmídeo contendo o gene repórter	54
4.1.4.	Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fracos responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(-).....	56
4.2.	Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(+)	61
4.2.1.	Construção do pBS2E- <i>P_{veg}</i> -Operon14-15 e do pBS1C-TP2-INT13- <i>sfGFP</i>	61
4.2.2.	Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(+).....	64
4.3.	Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes induzido por Quórum Sensing – SLP(+). <i>P_{srfA}</i>	70
4.3.1.	Construção do pBS1C- <i>P_{srfA}</i> -INT13- <i>sfGFP</i>	70
4.4.	Otimização dos RBSs dos genes 14 e 15 no Sistema de Lise Programada	72
4.4.1.	Construção do plasmídeo contendo apenas a deleção dos nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15 (pBS2E- <i>P_{veg}</i> -Operon14-15_mutação15)	73
4.4.2.	Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes com a mutação15.....	75
4.4.3.	Construção do plasmídeo contendo as deleções dos nucleotídeos próximos aos RBSs dos genes 14 e 15 (pBS2E- <i>P_{veg}</i> -Operon14-15_mutação14+15).....	83
4.4.4.	Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes com a mutação14+15	85
4.5.	Cultivo no Pioreactor	88

5. Discussão	92
6. Conclusões	97
Referências Bibliográficas	98
Apêndice A - Mapas dos plasmídeos construídos neste trabalho	105

1. Introdução

Biocompostos são moléculas estruturalmente complexas produzidas por organismos vivos. Entre eles, destacam-se os biofármacos. (Pande, *et al.* 2025). A produção de biofármacos tem crescido rapidamente em todo o mundo, entretanto o processo de produção e purificação destas biomoléculas ainda é bastante custoso, especialmente por serem produtos que requerem alto grau de pureza (Khanal; Lenhoff, 2020). Uma solução para a redução dos custos relacionados a este processo é o desenvolvimento de uma plataforma padronizada para a produção de biofármacos, que utilize uma linhagem produtora que gere alto rendimento de produção e facilite a extração e recuperação deste produto através da sua liberação para o meio extracelular.

Com isso, este projeto propôs o desenvolvimento de um Sistema de Lise Programada (SLP) utilizando a bactéria *Bacillus subtilis* como chassis (linhagem hospedeira). Esse sistema permitirá a lise das bactérias após a produção de quantidades substanciais da biomolécula, facilitando, assim, a recuperação do produto. Dessa forma, o sistema tem potencial para reduzir os custos do processo produtivo de biocompostos, como biofármacos. Foram desenvolvidas duas versões deste sistema, uma baseada no Sistema de Repressão Catabólica por Carbono e outra no Sistema de Quórum Sensing, sendo que ambas tiveram como base a ação de uma Serina Integrase e duas enzimas que causam a lise celular (Holina e Peptidoglicano Hidrolase).

1.1. *Bacillus subtilis* como chassis para produção de proteínas recombinantes

Um dos microrganismos mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas é a *Escherichia coli*. Durante muito tempo, as técnicas de biologia molecular foram prioritariamente desenvolvidas para esse microrganismo (Ruiz e Silhavy 2022). Isto porque o rápido crescimento e a fácil manipulação fizeram desta bactéria a plataforma preferida para o desenvolvimento de linhagens produtoras (İncir e Kaplan, 2024). Porém, características como a incapacidade de secretar proteínas, a síntese de endotoxinas e formação de corpos de inclusão elevam os custos do processo produtivo por este microrganismo (İncir

e Kaplan, 2024).

O problema é ainda maior quando se trata de produtos que requerem alto grau de pureza como os biofármacos. Microrganismos classificados como seguros (GRAS, do inglês *Generally Recognized as Safe*) podem servir como melhores plataformas para a produção destas moléculas, principalmente se forem capazes de exportar a proteína terapêutica para meio extracelular (Yang *et al.*, 2021). Com isso, uma alternativa para produção de biofármacos é a produção destas biomoléculas por *B. subtilis* (Yang *et al.*, 2021).

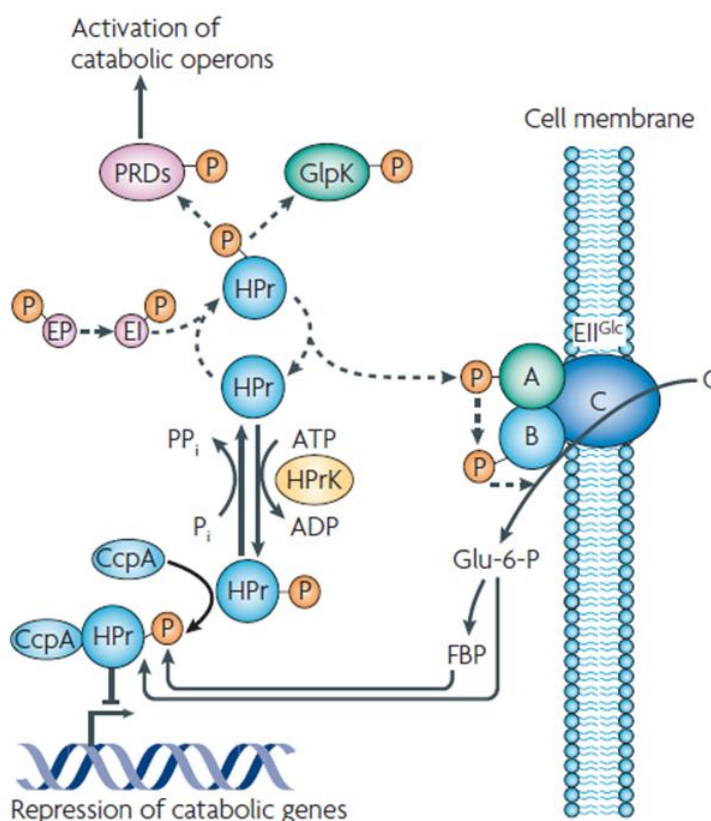
B. subtilis é uma bactéria Gram-Positiva classificada como GRAS, caracterizada por apresentar rápido crescimento, demandar meios de cultivo com componentes de baixo custo e ser facilmente adaptável à produção em escala industrial (Liu, *et al.*, 2018; Yang, *et al.*, 2021). Além disso, seu background genético é vastamente conhecido, o que possibilita a aplicação de diversas técnicas de edição gênica estabelecidas para esta bactéria (Yang, *et al.*, 2021). Outro fator que torna *B. subtilis* uma plataforma promissora para produção de proteínas recombinantes é a capacidade de produzir elevadas concentrações de proteínas, sendo bastante utilizado para a produção de enzimas em escala industrial (Yang, *et al.*, 2021). Devido à estas vantagens, *B. subtilis* foi selecionada como sistema hospedeiro neste trabalho.

1.2. Repressão Catabólica por Carbono

Bactérias heterotróficas são capazes de utilizar diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (Wen, *et al.*, 2021). Porém, existem fontes de carbono que são preferenciais para estes organismos, fontes que permitem um crescimento mais rápido para a bactéria ou que sejam mais abundantes no ambiente, fazendo com que a bactéria tenha vantagens em relação a outros organismos que podem estar competindo pelos nutrientes disponíveis no mesmo ambiente (Reuß, *et al.*, 2018; Wen, *et al.*, 2021). Uma das fontes de carbono preferenciais mais comuns para bactérias é a glicose (Reuß, *et al.*, 2018). Dessa forma, na presença de glicose, os genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de fontes de carbono secundárias estarão reprimidos ou não ativados. Este processo é denominado Repressão Catabólica

por Carbono (CCR, do inglês *Carbon Catabolite Repression*) (Völker, *et al.*, 2025). Em *B. subtilis*, o processo de CCR requer a ação de um fator de transcrição (CcpA), da proteína HPr e da enzima Hpr kinase/fosforilase (HprK) (Völker, *et al.*, 2025; Wen, *et al.*, 2021). Quando as concentrações de glicose-6-fosfato, frutose-1,6-bifosfato e ATP são elevadas, a enzima HprK é ativada. Esta enzima catalisa a fosforilação da HPr, no resíduo Ser46, formando a HPr(Ser-P) (Meyer, *et al.*, 2011). A HPr(Ser-P) se liga ao fator de transcrição CcpA, causando uma alteração na conformação desta molécula, que faz com seja possível sua ligação ao DNA da bactéria (Meyer, *et al.*, 2011).

Figura 1 - Sistema de Repressão Catabólica por Carbono em *B. subtilis*.



Fonte: Görke, *et al.*, 2008.

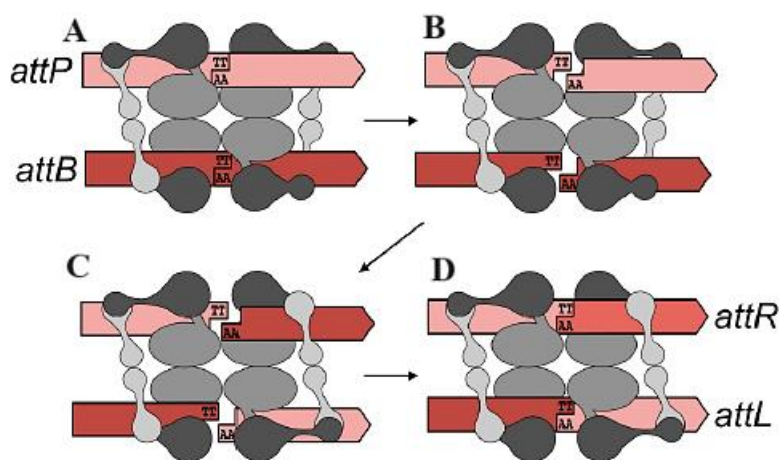
A presença da fonte de carbono mantém alta concentração de ATP nas células. Assim, o fator de transcrição CcpA interage com a proteína Hpr fosforilada e com isso liga-se ao sítio CRE reprimindo a expressão dos genes que codificam biomoléculas envolvidas no catabolismo de fontes secundárias de carbono. Quando a fonte de carbono é exaurida, a concentração de ATP é reduzida e o AMP se acumula, levando a CcpA a se desligar do sítio CRE, liberando a produção destes biocompostos.

O complexo CcpA-HPr(Ser-P) se liga a uma sequência de DNA palindrômica denominada CRE (do inglês, *Catabolite Responsive Element*, ou seja, Elemento Responsivo de Catabolismo). Usualmente, estes sítios encontram-se nas regiões promotoras, onde a transcrição dos genes tem início, porém, em alguns casos podem estar a jusante distantes desta região (Wen, *et al.*, 2021). A ligação entre o CcpA-HPr(Ser-P) e o sítio CRE impede a ação da RNA Polimerase e, com isso, reprime a transcrição do gene que se encontra sob controle do promotor em questão (Wen, *et al.*, 2021). Quando as concentrações de glicose-6-fosfato, frutose-1,6-bifosfato e ATP são baixas e a concentração de fosfato inorgânico é alta, indicando a ausência da fonte preferencial de carbono, a HPr(Ser-P) é desfosforilada e o complexo é desestruturado, desfazendo assim a ligação entre o CcpA-HPr(Ser-P) e o sítio CRE e ativando a expressão de genes relacionados ao catabolismo de fontes de carbono secundárias (Görke; Stülke, 2008; Wen, *et al.*, 2021).

1.3. Serina Integrases

Recombinases Sítio Específicas são enzimas que promovem a recombinação do DNA em locais específicos, sem a necessidade de uma sequência homóloga ou de degradação ou síntese do DNA (Merrick, *et al.*, 2018). As Serina Integrases são codificadas por fagos e classificadas como uma subfamília das Recombinases Sítio Específicas que promovem a quebra da fita dupla de DNA no seu sítio de reconhecimento (Merrick, *et al.*, 2018). A recombinação realizada pela Serina Integrase é altamente específica e apenas reversível na presença de um Fator de Direcionalidade de Recombinação (RDF, do inglês *Recombination Directionality Factor*) (Merrick, *et al.*, 2018; Wang, *et al.*, 2016).

Figura 2 - Mecanismo de ação da Serina Integrase.



Fonte: Adaptado de Merrick, *et al.* (2018).

(A) Serina Integrase forma um tetrâmero que se liga aos sítios de recombinação *attP* e *attB*, **(B)** cliva a dupla fita nos sítios, e então duas subunidades da recombinase rotacionam **(C)** invertendo as fitas ligadas a elas. As extremidades geradas na clivagem dos sítios são complementares e, assim, são reconectadas **(D)** formando os novos sítios *attR* e *attL*.

Inicialmente, a Serina Integrase se liga a cada sítio *attP* e *attB* como um dímero, formando um tetrâmetro, o que faz com que os sítios se aproximem. Posteriormente, os sítios-ativo da Serina Integrase promovem a clivagem dos sítios de recombinação *attP* e *attB*, gerando extremidades 3' coesivas de duas bases de comprimento (Merrick, *et al.*, 2018). Em seguida, duas subunidades da Integrase rotacionam fazendo com que metade de cada sítio seja rotacionado com elas, uma vez que estão ligados a ela por ligação 5' fosfoserina (Merrick, *et al.*, 2018). Como as extremidades formadas pela clivagem dos sítios são complementares entre si, após a rotação, estas extremidades são religadas formando os novos sítios *attR* e *attL* (Merrick, *et al.*, 2018).

Serina Integrases podem ser utilizadas para a inserção de genes no cromossomo a partir de um plasmídeo, quando cada molécula tem um dos sítios de recombinação, ou para inverter o sentido de um trecho de DNA, quando os dois sítios estão alocados na mesma molécula (Merrick, *et al.*, 2018). Entre as vantagens da recombinação por Serina Integrases está o fato de não necessitarem de modificações em suas sequências de acordo com o DNA que será modificado, além de não necessitarem de outros fatores celulares para ação. Além disso, a modificação é irreversível na ausência do Fator de

Direcionalidade de Recombinação (Merrick, *et al.*, 2018).

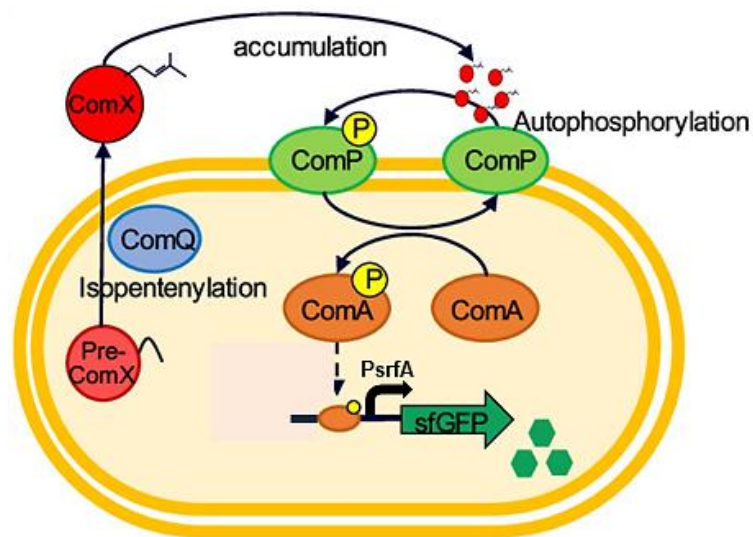
Yang, *et al.* (2014) identificaram 34 Serina Integrases inéditas e seus respectivos sítios *attP* e *attB*. Destas, 13 Integrases foram selecionadas e tiveram sua eficiência testada em *E. coli* utilizando o gene da Proteína Verde Fluorescente como repórter (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*). O gene que codifica a GFP foi clonado em sentido contrário ao do promotor e flanqueado pelos sítios *attP* e *attB* de cada Serina Integrase. A expressão dos genes que codificam as Serina Integrases estava sob controle de um promotor induzível por arabinose. Com isso, a produção das Serina Integrases resultaria na inversão do sentido do gene da GFP e a consequente ativação da síntese da proteína. O estudo identificou 11 Integrases funcionais e ortogonais, dentre elas a Integrase 13 (Int13) que foi aplicada neste trabalho.

1.4. Quórum Sensing em *B. subtilis*

Quórum Sensing é um sistema regulatório que responde à concentração de uma molécula sinal, modulando em resposta a expressão de diversos genes. A molécula sinal é produzida pela própria célula a taxa constante, sendo a concentração dela no meio diretamente proporcional à densidade populacional (Wu, *et al.*, 2025). Este tipo de sistema é vantajoso por favorecer o acúmulo de células no cultivo antes da produção de determinados metabólitos, que podem prejudicar o crescimento do microrganismo caso a produção ocorra em momento precoce (Zeng *et al.*, 2023). Além disso, Quórum Sensing pode regular comportamentos coletivos, como por exemplo, induzir a produção de biofilmes (Yin *et al.*, 2019).

O sistema de Quórum Sensing ComQXPA de *B. subtilis* regula a produção de surfactina em nível transcricional, além de controlar a síntese de determinadas proteases extracelulares (Wu, *et al.*, 2025). Este sistema tem como base a ação do peptídeo ComX, da Isopreno Transferase ComQ, da Histidina Quinase Transmembrana ComP e da proteína regulatória ComA, que se liga a sítios promotores, como o P_{srfA} , ativando a transcrição (Xu, *et al.*, 2021).

Figura 3 - Sistema Quórum Sensing ComQXPA de *B. subtilis*.



Fonte: Adaptado de Xu, *et al.* (2021).

ComX consiste em uma molécula sinal que é transportada para o meio extracelular (membrana plasmática representada em amarelo na figura). Conforme a concentração celular aumenta e, com isso, a concentração de ComX no meio atinge um determinado limiar, o sinal induz a autofosforilação da ComP na membrana. Internamente na célula, ComP transfere o grupo fosfato para ComA, a qual se liga ao promotor P_{srfA} , induzindo o início da transcrição.

Após sintetizada, o peptídeo ComX é modificado pela Isopreno Transferase ComQ para sua forma ativa e transportado para o meio extracelular. À medida que as células de *B. subtilis* se multiplicam, o peptídeo-sinal ComX se acumula no meio. No momento em que o cultivo atinge a concentração crítica de células e, com isso, de ComX, a Histidina Quinase Transmembrana ComP detecta o aumento desse sinal e catalisa a autofosforilação. A ComP transfere o grupo fosfato para a ComA, a qual se liga a um sítio específico do promotor P_{srfA} ativando a transcrição dos genes regulados pelo mesmo (Xu, *et al.*, 2021).

1.5. Holina e Peptdeoglicano Hidrolase, enzimas que promovem a lise celular

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias. Para isso, injetam seu material genético no interior da célula hospedeira, usam a célula para síntese das proteínas e material genético virais e, posteriormente, induzem a lise celular, liberando novas partículas virais capazes de infectar outras células (Xiang, *et al.*, 2021). O Sistema de Lise Programada, desenvolvido neste trabalho, contém dois genes derivados do bacteriófago Phi29, os quais codificam enzimas responsáveis pela lise celular. Um destes genes codifica uma Holina. Esta enzima, após acumular nas células, atua na formação de poros na membrana citoplasmática da bactéria (Guliy; Evstigneeva, 2024). Estes poros tornam o peptdeoglicano acessível à segunda enzima que compõe o Sistema de Lise Programada, a Peptidoglicano Hidrolase. Esta endolisina catalisa a hidrólise do peptidoglicano na membrana (Guliy; Evstigneeva, 2024). Dessa forma, a combinação das duas enzimas promove o rompimento celular.

2. Objetivos

Desenvolver um Sistema de Lise Programada em *B. subtilis* com potencial para integrar plataformas de produção de proteínas terapêuticas, visando eliminar os custos relacionados ao rompimento celular para a extração e recuperação do produto.

2.1. Objetivos Específicos

- Construir linhagens de *B. subtilis* contendo o Sistema de Lise Programada sob diferentes regimes de controle de expressão gênica, sendo estes a Repressão Catabólica por Carbono e Quórum Sensing.
- Construir um operon de lise contendo os dois genes que codificam enzimas responsáveis por promover a lise celular.
- Avaliar o efeito de promotores com diferentes intensidades na regulação da expressão dos genes que constituem o sistema.
- Testar diferentes meios de cultivo a fim de identificar o meio que promova maior crescimento celular, produção proteica e ativação do Sistema de Lise Programada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais e Equipamentos

Neste item, são apresentadas as enzimas utilizadas neste trabalho como enzimas de restrição, DNA Ligase, DNA Polimerases, entre outras. Além disso, estão apresentados os equipamentos e os kits usados no desenvolvimento deste projeto.

A enzima de restrição *Bsal* aplicada no trabalho foi a *Bsal*-HF®v2 (New England Biolabs, NEB). Nos momentos em que foi utilizada a *Bsal* da marca Thermo Fisher Scientific™, esta foi denominada de *Eco31I*. A enzima *NheI* foi obtida da empresa ©Cellco Biotech, e as enzimas *BsmBI*-v2 e *SfiI* obtidas da New England Biolabs. As demais enzimas de restrição são do tipo *FastDigest* da marca Thermo Fisher Scientific™, assim como a T4 DNA Ligase, a *DpnI* e a Fosfatase Alcalina Termosensível (*FastAP*).

As DNA polimerases utilizadas para realizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram a Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific™) a TIME ECRA HIFI DNA Polimerase (ECRA Biotech™) a Easy Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia). Todas as reações de PCR ocorreram no termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (©Bio-Rad Laboratories, Inc) e foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corado com Sybr Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific™). Os géis de agarose foram revelados no fotodocumentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad) com o auxílio do *software* ImageLab. O marcador de massa molecular utilizado foi o GeneRuler 1,0 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

As PCRs e as reações de digestão foram purificadas com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O kit utilizado para extração de DNA plasmidial foi o Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (©Cellco Biotech). Os kits para extração do DNA genômico foram o Wizard® SV Genomic DNA Purification Kit e o Bacteria DNA Preparation Kit (©Cellco Biotech).

Após as etapas de purificação de produtos de PCR, digestões e extração de DNA plasmidial e genômico, a quantificação dos ácidos desoxirribonucleicos foi realizada em leitor de placas Tecan InfiniteM200 Pro (Tecan™). As medidas

de fluorescência e densidade ótica foram feitas no mesmo leitor de placas.

Os sequenciamentos dos plasmídeos resultantes dos processos de clonagem foram feitos pelo método de Sanger, utilizando o kit BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific™). Inicialmente, as amostras eram sequenciadas em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Unesp-Araraquara. Posteriormente, as amostras passaram a ser enviadas pra a Unesp-Botucatu (IBTec/UNESP).

Por fim, as simulações e análises *in silico* foram realizadas no *software Benchling*, e otimizadas usando o *RBS Calculator* (SalisLab) (Salis; Reis, 2020).

3.2. Métodos de clonagem e transformação bacteriana

Estão descritos neste tópico os métodos que foram utilizados em todos os processos de clonagem para o desenvolvimento das diferentes linhagens de bactérias geneticamente modificadas neste trabalho.

3.2.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCRs foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante e tiveram algumas diferenças de acordo com a enzima utilizada (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Componentes das Reações em Cadeia da Polimerase para TIME HIFI DNA Polimerase e Phusion™ High-Fidelity DNA Polimerase.

Componentes da Reação	Quantidades
Tampão da DNA Polimerase 5x	4 µL
dNTP 10 mM	0,4 µL
Primer Direto 10 uM	1,0 µL
Primer Reverso 10 uM	1,0 µL
DNA molde	40 ng
DNA Polimerase	0,2 µL
H ₂ O	Completar a 20 µL

Fonte: Autora (2025).

A tabela apresenta os componentes das reações realizadas neste trabalho e suas respectivas quantidades.

Tabela 2 - Componentes das Reações em Cadeia da Polimerase para Easy Taq DNA Polimerase.

Componentes da Reação	Quantidades
Tampão 10x sem MgCl ₂	2 µL
dNTP 10 mM	0,4 µL
Primer Direto 10 uM	1,0 µL
Primer Reverso 10 uM	1,0 µL
DNA molde	40 ng
MgCl ₂ 25 mM	0, 6 µL
DNA Polimerase	0,2 µL
H ₂ O	Completar a 20 µL

Fonte: Autora (2025).

A tabela apresenta os componentes das PCRs utilizando a Taq DNA Polimerase realizadas neste trabalho e suas respectivas quantidades.

O programa aplicado no termociclador variou de acordo com o protocolo da DNA Polimerase utilizada e está apresentado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Programa no termociclador aplicado para as enzimas TIME HIFI DNA Polimerase e Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase.

Etapas	Temperatura e duração	Ciclos
Desnaturação Inicial	98°C durante 30s	1
Desnaturação	98°C durante 10s	35
Anelamento	5°C abaixo da Temperatura de <i>Melting</i> durante 30s	35
Extensão	72°C durante 30s/Kb	35
Extensão Final	72°C durante 10min	1

Fonte: Autora (2025).

Estão apresentados as temperaturas e os tempos de duração utilizados em cada etapa da PCR, além dos números de ciclos realizados.

Tabela 4 - Programa no termociclador aplicado para as enzimas Easy Taq DNA Polymerase.

Etapas	Temperatura e duração	Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C durante 5min	1
Desnaturação	95°C durante 30s	35
Anelamento	5°C abaixo da Temperatura de <i>Melting</i> durante 30s	35
Extensão	72°C durante 30s/Kb	35
Extensão Final	72°C durante 10min	1

Fonte: Autora (2025).

A tabela apresenta as temperaturas e os tempos de duração utilizados em cada ciclo da PCR, além dos números de ciclos realizados em cada etapa.

Os produtos das PCRs obtidos com as enzimas Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase e TIME HIFI DNA Polimerase foram usados nos procedimentos de clonagem. As PCRs de colônia foram realizadas com a enzima Easy Taq DNA Polimerase, com o DNA molde substituído por 2 µL de células rompidas por choque térmico. Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), a 110 V durante 40 min.

Para o rompimento celular, 200 µL de células cultivadas em 5 mL do Caldo Lisogênico, (LB, do inglês *Lysogeny Broth*) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, pH 7,0) suplementado com antibiótico (quando necessário), foram centrifugados a 17.000 xg durante 1 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 µL de água ultrapura e então incubadas em gelo por 5 min. Posteriormente, foram realizados 4 ciclos que consistiram em 1 minuto no micro-ondas seguido por 30s no gelo. Após os ciclos, as células rompidas foram novamente incubadas em gelo durante 5 min e então utilizadas como molde na PCR de colônia.

3.2.2. Digestão por enzimas de restrição

As digestões foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante

das enzimas de restrição. Em cada reação de digestão foram adicionados 800 ng de DNA e 1 µL de cada enzima de restrição. Os componentes das digestões pelas enzimas da Thermo Fisher Scientific™ e da New England Biolabs (NEB), assim como os seus respectivos volumes, estão indicados na Tabela 5. Em todas as reações, o volume total de enzimas de restrição não ultrapassou 10% do volume total da reação. O tampão de digestão das enzimas da Thermo Fisher Scientific™ foi o FastDigest 10x e o tampão de digestão das enzimas da NEB variou de acordo com a enzima e foi escolhido com base nas informações do fabricante.

Na reação de digestão dos plasmídeos, além das enzimas de restrição, foi adicionado 1 µL da FastAP, a qual desfosforila as extremidades de DNA resultante da digestão com a finalidade de impedir que a parte que foi removida na digestão se ligue novamente ao plasmídeo (Ribeiro, *et al.*, 2024). Na reação de digestão de sequências resultantes de PCR, foi adicionado 1 µL a *DpnI* para digestão do molde da PCR (Yang, *et al.*, 2022). A temperatura e o tempo de incubação variaram de acordo com a enzima utilizada. Todas as reações de digestão foram purificadas com kit comercial e o produto de DNA resultante foi quantificado.

Tabela 5 - Componentes das reações de digestão por enzimas de restrição.

Componentes da Reação	Quantidades
DNA	800 ng
<i>FastDigest Buffer</i> 10x ou Tampão NEB10x	4,0 µL
Enzima de Restrição	1,0 µL
<i>FastAP</i> (plasmídeo) ou <i>DpnI</i> (produto de PCR)	1,0 µL
H ₂ O	Completar a 40 µL

Fonte: Autora (2025).

A tabela apresenta os componentes das reações de digestão e suas respectivas quantidades. Os componentes variaram de acordo com a enzima utilizada e com o DNA a ser digerido.

3.2.3. Ligação de sequências de DNA pela T4 DNA Ligase

Os componentes das reações de ligação foram: 1 µL do tampão 10x T4 Buffer, 0,5 µL da T4 DNA Ligase e água ultrapura para completar os 10 µL de reação. As quantidades de plasmídeo e insertos foram calculadas nos sites *Ligation Calculator Insilico* (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) e *Ligation Calculator* MDApp (<https://www.mdapp.co/ligation-calculator-545>). Para todas as reações de ligação foi realizado um controle negativo, o qual consistiu nos mesmos componentes da ligação exceto pelos insertos, que foram substituídos por água. As reações de ligação e controle negativo foram incubadas a 22°C durante 2 h.

3.2.4. Produção de células de *Escherichia coli* quimicamente competentes

Para a produção de células de *E. coli* quimicamente competentes, as bactérias foram inoculadas a uma densidade ótica a 600 nm (DO600) entre 0,03-0,05 em 100 mL de meio LB líquido e incubadas a 37°C e agitação de 220 rpm até atingirem DO600 entre 0,3-0,4. Em seguida, as bactérias foram transferidas para 2 tubos de centrifugação de 50 mL, previamente resfriados em gelo, e centrifugadas durante 10 min a 5.000 xg e 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as bactérias foram ressuspensas em 20 mL de CaCl₂ 0,1 M também previamente resfriado em gelo. As bactérias foram incubadas no gelo durante 20 min, e então centrifugadas por 10 min a 5.000 xg a 4°C e ressuspensas em 2 mL de CaCl₂ 0,1 M/ glicerol 10% (v/v). Foram realizadas alíquotas das bactérias quimicamente competentes, as quais foram armazenadas em ultra freezer a -80°C.

3.2.5. Transformação de *E. coli* por choque térmico

As transformações de *E. coli* quimicamente competentes foram realizadas da seguinte maneira: foram adicionados 50 µL das células competentes a 10 µL de reação de ligação. A mistura foi incubada em gelo por 30 min. Após, a mistura foi submetida a choque térmico por incubação em banho-maria a 42°C por 30s seguida de incubação em gelo por 2 min. Posteriormente,

adicionou-se 250 µL do meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,584 g/L, KCl 0,186 g/L, MgSO₄ 2,4 g/L, e glicose 0,4% (m/v) pH 7,5). A mistura foi incubada por 1 h, a 37°C e 220 rpm.

As bactérias resultantes da transformação foram plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com o antibiótico cujo gene de resistência encontra-se no plasmídeo usado. As placas permaneceram em estufa bacteriológica a 37°C durante 12 h. Após este período, as colônias potencialmente transformantes foram inoculadas em meio LB líquido suplementado com o mesmo antibiótico e incubadas a 37°C e 220 rpm por 12 h. Posteriormente, os plasmídeos foram extraídos das culturas para confirmação da correta construção por digestão e sequenciamento. Após a confirmação, as colônias positivas foram estocadas em glicerol 20% (v/v) em ultra freezer a -80°C.

3.2.6. Produção de *B. subtilis* competente

Inicialmente, as células de *B. subtilis* foram inoculadas em 20 mL de meio SpC (20 mL de T Base – (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, K₂HPO₄·3H₂O 18,3 g/L, KH₂PO₄ 6 g/L, citrato de sódio·2H₂O 1 g/L –, 0,2 mL de glicose 50% (m/v), 0,3 mL de MgSO₄·3H₂O 1,3% (m/v), 0,4 mL de extrato de levedura 10% (m/v), 0,5 mL de casaminoácidos 1% (m/v) e triptofano 20 µg/mL) a uma DO₆₀₀ de 0,5 e incubadas a 37°C e 220 rpm. Quando as bactérias atingiram a fase estacionária de crescimento, 2 mL da cultura foram inoculados em 200 mL meio SpII pré-aquecido (200 mL de T Base, 2 mL de glicose 50% (m/v), 14 mL de MgSO₄·3H₂O 1,3% (m/v), 2 mL de extrato de levedura 10% (m/v), 2 mL de casaminoácidos 1% (m/v), 1 mL de CaCl₂ 0,1 M e triptofano 20 µg/mL). A mistura foi incubada a 37°C e 180 rpm durante 90 min. Em seguida, as células foram transferidas para 4 tubos de centrifugação de 50 mL e centrifugadas a 8.000 xg durante 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi realocado para um recipiente estéril. As células foram ressuspensas em um total de 12 mL do sobrenadante mais 8 mL de glicerol 50% e então foram aliquotadas e armazenadas em ultra freezer a -80°C. (Bron, *et al.*; 1999).

3.2.7. Transformação de *B. subtilis*

Nesta etapa, foram adicionados entre 500 e 1.500 ng de plasmídeo a 250 µL de células de *B. subtilis* competentes, as quais foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Em seguida, foram adicionados 250 µL de meio SpII + EGTA (200 mL de SpII sem CaCl₂ e 4 mL de EGTA 0,1 M, pH 8,0). A mistura foi incubada durante 2 h a 37°C e 220 rpm. Por fim, as células foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com o antibiótico específico para o plasmídeo em uso, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 12 h. (Bron, *et al.*; 1999; Vojcic, *et al.*, 2012). As transformações foram confirmadas por PCR de colônia ou através da PCR do DNA genômico extraído das colônias resultantes do processo, seguido pelo sequenciamento das PCRs. Com isso, 3 colônias positivas foram estocadas em glicerol 20% (v/v) em ultra freezer a -80°C.

3.3. Quantificação de Açúcares Redutores

Neste trabalho, a quantificação de glicose, após determinados cultivos, foi realizada através do método colorimétrico DNS. Este método permite a identificação de açúcares redutores que, assim como a glicose e a frutose, são açúcares que possuem a capacidade de reduzir outras substâncias devido a presença de um aldeído ou cetona livre em sua estrutura (Franco, *et al.*; 2021). Este método tem como base a reação entre o Ácido 3,5-dinitrosalicílico e o açúcar redutor gerando o Ácido 3-amino-5-nitrosalicílico o qual absorve luz a 540nm (Teixeira; Santos, 2022). Para isto, foram misturados 500 µL de amostra (sobrenadante do cultivo) com 500 µL do reagente DNS. A mistura foi incubada em banho seco a 100°C durante 10 min e, em seguida foi adicionado 0,5 mL de água ultrapura. Com isso, foi medida a absorbância das amostras resultantes no comprimento de onda 540 nm. A quantificação da glicose teve como base a curva padrão construída a partir de diferentes concentrações de glicose.

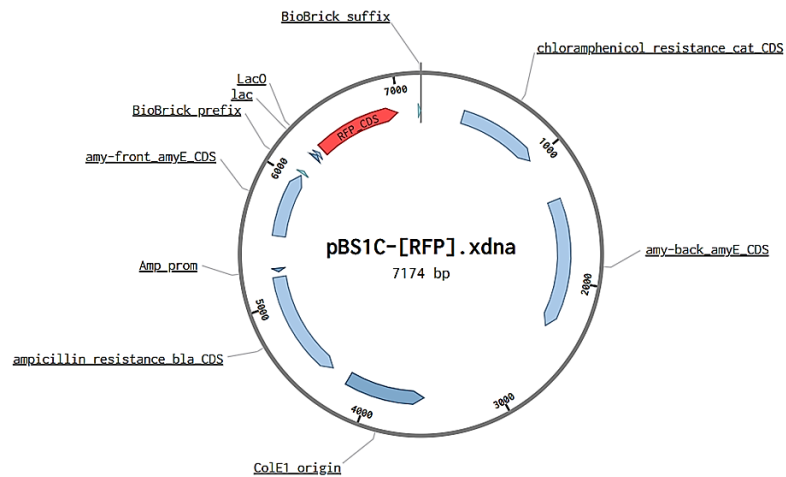
3.4. Sistema de Lise Programada

O Sistema de Lise Programada (SLP) é composto por dois plasmídeos integrativos em *B. subtilis*. Um destes plasmídeos carrega os genes 14 e 15 que compõem o Operon14-15. Já o outro plasmídeo contém o gene repórter e o gene que codifica a Serina Integrase 13. A Integrase 13, quando sintetizada, deve inverter o sentido de codificação do Operon14-15 que, inicialmente, está codificado no sentido oposto ao do promotor que guia a sua transcrição e está flanqueado pelos sítios de reconhecimento da Integrase 13. Com isso, o Operon14-15 passará a ser codificado no mesmo sentido do promotor e a expressão dos genes 14 e 15 será ativada.

Estes genes têm como origem o bacteriófago de *Bacillus sp* denominado Phi29 (Meijer, *et al.*, 2001). O gene 14 codifica uma proteína Holina e o gene 15 codifica a enzima Peptidoglicano Hidrolase. A Peptidoglicano Hidrolase é responsável pela hidrólise do peptidoglicano e a Holina forma poros na membrana da bactéria, dessa forma, a combinação das duas enzimas deve resultar na lise eficaz da *B. subtilis* (Meijer, *et al.*, 2001).

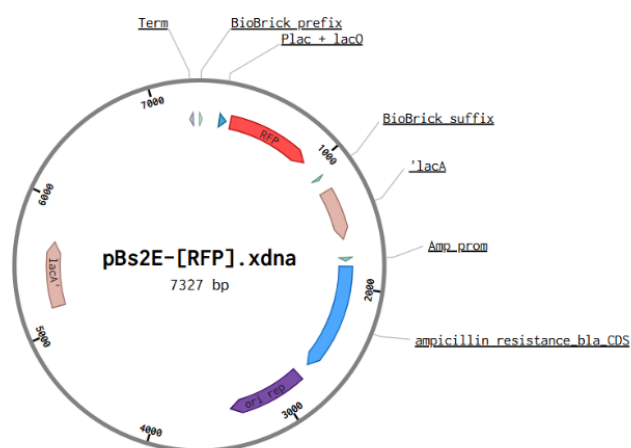
O plasmídeo integrativo que carrega o gene repórter e o gene que codifica a Integrase 13 é o pBS1C (Figura 4) (Radeck *et al.*, 2013). Este vetor integra no *locus amyE* do genoma da bactéria *B. subtilis* e fornece resistência aos antibióticos ampicilina em *E. coli* e cloranfenicol em *B. subtilis*. O plasmídeo que carrega o Operon14-15 é o pBS2E (Figura 5) o qual é integrativo no *locus lacA* do genoma da *B. subtilis* e fornece resistência aos antibióticos ampicilina em *E. coli* e eritromicina em *B. subtilis* (Radeck *et al.*, 2013).

Figura 4 - Mapa do plasmídeo pBS1C.



Fonte: Banco de dados do grupo pesquisa SynBio UNESP-Araraquara (2021). Neste mapa, as sequências homólogas responsáveis pela integração do plasmídeo no genoma da bactéria estão apresentadas como *amy-front_amyE CDS* e *amy-back_amyE CDS*. As unidades de transcrição dos genes que codificam a Integrase 13 a proteína repórter foram inseridas entre o *BioBrick prefix* e o *BioBrick suffix* indicados no mapa, substituindo a unidade de transcrição da Proteína Vermelho Fluorescente (RFP, do inglês *Red Fluorescent Protein*).

Figura 5 - Mapa do plasmídeo pBS2E.



Fonte: Banco de dados do grupo pesquisa SynBio UNESP-Araraquara (2021). As sequências homólogas que promovem a integração do plasmídeo no genoma da *B. subtilis* estão apresentadas como *lacA'* e *'lacA*. A unidade de transcrição do Operon14-15 foi inserida entre o *BioBrick prefix* e *BioBrick suffix* substituindo a unidade de transcrição da RFP.

No próximo tópico estão descritas as metodologias aplicadas na construção do Sistema de Lise Programada e suas variações. Os mapas dos plasmídeos construídos estão apresentados nos Apêndices.

3.4.1. Sistema de Lise Programada com Promotores Fracos responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(-).

3.4.1.1. Construção do plasmídeo que contém o Operon14-15 sob controle do promotor fraco SP133 (pBS2E-SP133-Operon14-15)

As sequências de nucleotídeos correspondentes ao gene 14 (Gene ID: 6446519) e gene 15 (Gene ID: 6446520) foram obtidas a partir do NCBI e usadas para construir a sequência do Operon14-15, contendo os genes 14 e 15 controlados pelo promotor sintético SP133. As sequências dos dois genes foram codificadas na fita reversa e flanqueadas pelos sítios de reconhecimento da integrase *attP* e *attB*. Desta forma, a ação da enzima deve inverter o sentido dos genes, colocando-os no mesmo sentido do promotor. Além disso, foram adicionados os sítios da *EcoRI* e *XbaI* à montante do promotor e os sítios da *SpeI* e *PstI* à jusante ao terminador da transcrição dos genes. A unidade de transcrição do Operon14-15 foi sintetizada pela empresa Twist Bioscience.

Esta unidade de transcrição foi amplificada por PCR e digerida pelas enzimas *EcoRI* e *PstI*. O plasmídeo pBS2E foi digerido pelas mesmas enzimas e então foi realizada a ligação das duas partes na proporção 1:5 (plasmídeo:inserto). O plasmídeo resultante da ligação foi usado para transformar *E. coli* TOP10. As colônias obtidas após o processo de transformação tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* a fim de identificar o plasmídeo potencialmente positivo. Os fragmentos de DNA resultantes das digestões foram verificados através da eletroforese das mesmas em gel de agarose 1% (m/v). Em seguida, os plasmídeos potencialmente positivos foram sequenciados.

Após confirmação da sequência positiva, 1.500 ng do plasmídeo pBS2E-SP133-Operon14-15 foram usados para transformar a linhagem *B. subtilis* KO7. A transformação foi confirmada por sequenciamento da PCR de colônia.

3.4.1.2. Construção do plasmídeo que contém o gene que codifica a Integrase 13 sob controle do promotor fraco SP130 (pBSIC-SP130-INT13)

Primeiramente, foi construído o plasmídeo contendo o gene que codifica a Integrase 13 e os sítios CRE (pBSIC-SP130-INT13) para, posteriormente, ser adicionado o gene repórter ao mesmo. As primeiras tentativas de construir o plasmídeo pBSIC-SP130-INT13 envolveram a ligação de 3 partes: vetor, promotor SP130 e o gene que codifica a Integrase 13. Para isto, o promotor foi obtido na forma de oligonucleotídeos fitas direta e reversa as quais foram aneladas. Localizados à montante a sequência do promotor estavam o sítio de restrição da enzima *EcoRI* e os dois sítios CRE, e à jusante ao promotor estava o sítio da *XhoI*. Para o anelamento das duas fitas, estas foram misturadas pela adição de 10 µL de cada a 100 µM e 80 µL de água livre de nucleases. A mistura foi incubada a 100°C durante 10 min em banho seco e resfriada vagarosamente até a temperatura ambiente.

O gene que codifica a Integrase 13 foi amplificado por reação de PCR. O molde utilizado foi um plasmídeo replicativo em *E. coli* previamente construído por Franco *et al.* (2023). O primer direto adicionou o sítio da enzima *XhoI* e a sequência do Sítio de Ligação do Ribossomo R0 (Guiziou *et al.*, 2016). O primer que anela na fita reversa adicionou os sítios das enzimas *EcoRI* e *XbaI*.

Para a ligação, o plasmídeo pBS1C foi digerido pelas enzimas *EcoRI* e *SpeI*, a sequência do promotor foi digerida pelas enzimas *EcoRI* e *XhoI*, e o gene da Integrase 13 foi digerido pela *XhoI* e a *XbaI*. Considerando que as extremidades resultantes das digestões pela *SpeI* e *XbaI* são complementares, esperava-se que as três partes fossem se ligar e resultar no pBSIC-SP130-INT13. A ligação foi realizada na proporção utilizada foi de 1:10:3 (plasmídeo:promotor:gene). Com apenas resultados negativos nesta clonagem, optou-se por mudar a estratégia para realizar a construção por etapas. A primeira etapa consistiu na inserção do gene da Integrase 13. O gene foi amplificado por PCR já com a adição do RBS pelo primer direto. O produto resultante e o plasmídeo pBS1C foram digeridos pelas enzimas *XbaI* e *SpeI* e então foi

realizada a ligação entre as partes na proporção 1:5 (plasmídeo:inserto). O plasmídeo resultante foi usado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10. A construção foi confirmada pelo sequenciamento dos plasmídeos extraídos das colônias resultantes da transformação.

Na segunda etapa, foi realizada a inserção do promotor e dos sítios CRE ao plasmídeo. Para isto, foi realizada uma PCR deste plasmídeo. Durante a PCR, o primer reverso adicionou o promotor com os sítios CRE. Tanto o primer reverso como o direto adicionaram o sítio de restrição da *SpeI* para circularização do produto. Após a confirmação da PCR por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), o plasmídeo foi digerido pela *SpeI* e sua forma circular foi reestabelecida através da reação de ligação pela T4 DNA ligase. O produto da ligação foi usado para transformar *E. coli* TOP10 quimicamente competente.

Os plasmídeos das colônias resultantes da transformação foram extraídos a fim de verificar se a clonagem foi bem-sucedida. O primeiro teste consistiu na digestão destes plasmídeos pelas enzimas de restrição *SpeI* e *Eco31I*. Foi selecionado um plasmídeo de uma colônia potencialmente positiva e este plasmídeo foi sequenciado para confirmação da construção.

3.4.2. Construção do plasmídeo contendo o gene repórter

Com o objetivo de testar a funcionalidade do Sistema de Lise Programada, foi escolhida a Proteína Verde Fluorescente (*sfGFP*) como repórter. Esta proteína permite que o sistema seja testado através da medida de fluorescência intra- e extracelular e a comparação entre os valores indicará se a *sfGFP* estará sendo liberada para o meio extracelular. Com isso, a construção do plasmídeo contendo o gene repórter consistiu na clonagem deste gene no plasmídeo pBS1C-SP130-INT13 previamente construído, a fim de gerar o plasmídeo pBS1C-SP130-INT13-*sfGFP*.

Para isto, um plasmídeo replicativo contendo o gene que codifica a *sfGFP* sob controle do promotor P_{veg} foi digerido pelas enzimas *SpeI* e *XbaI* para possibilitar a obtenção da unidade de transcrição da *sfGFP*. Já o plasmídeo pBS1C-SP130-INT13 foi digerido pela enzima *SpeI*. Os produtos das reações foram purificados a partir de gel de agarose 1% (m/v) utilizando o kit comercial,

e usados em reação de ligação entre as duas partes na proporção 1:5 (plasmídeo:inserto). A ligação foi usada para transformar *E. coli* TOP10. A seleção das colônias positivas foi realizada pela análise de fluorescência sob a luz negra. As colônias que emitiram fluorescência foram consideradas positivas. Adicionalmente, a confirmação do tamanho do plasmídeo construído foi realizada através da digestão do plasmídeo extraído de *E. coli* TOP10 pelas enzimas *Bsa*I e *Spe*I. A seguir, 1.500 ng do plasmídeo positivo foram usados para transformar *B. subtilis* KO7 *lacA::Operon14-15*. A seleção das colônias positivas também foi realizada através da análise de fluorescência sob a luz negra.

3.4.3. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(+).TP2

3.4.3.1. Construção do plasmídeo que contém o Operon14-15 sob controle do promotor forte P_{veg} (pBS2E- P_{veg} -Operon14-15)

O promotor P_{veg} foi obtido na forma de oligonucleotídeos fita direta e reversa as quais foram aneladas. Além da sequência do P_{veg} , as fitas apresentavam a sequência do sítio de restrição da enzima *Sa*II e as extremidades complementares às extremidades resultantes da digestão pelas enzimas *Xba*I e *Xho*I.

Para a adição do promotor P_{veg} para o controle da transcrição do Operon14-15, o plasmídeo pBS2E-SP133-Operon14-15 foi digerido pelas enzimas *Xba*I e *Xho*I, o que removeu o promotor SP133.

Para que fosse possível ocorrer a ligação entre o plasmídeo digerido e desfosforilado e o P_{veg} , a sequência do P_{veg} resultante do anelamento foi fosforilada em reação contendo 1.000 ng da sequência anelada, 5 μ L do tampão da T4 DNA Ligase, 1 μ L da enzima T4 Polinucleotídeo Quinase e 43,35 μ L de água ultrapura para completar 50 μ L de reação. A reação foi incubada a 37°C durante 1 h e inativada a 65°C durante 20 min. A reação de ligação entre as duas partes foi realizada na proporção 1:100 (plasmídeo:inserto). O plasmídeo resultante da ligação foi usado para transformar *E. coli* TOP10.

Os plasmídeos das colônias resultantes do processo de transformação foram extraídos e digeridos pela enzima *SaI* a fim de testar a transformação e selecionar plasmídeos para serem sequenciados. Os fragmentos resultantes da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Os plasmídeos potencialmente positivos foram sequenciados. O plasmídeo pBS2E-*P_{veg}*-Operon14-15 (1.500 ng) foi então usado para transformar *B. subtilis* KO7, sendo a transformação confirmada pelo sequenciamento da PCR de colônia das colônias resultantes do processo.

3.4.3.2. Construção do plasmídeo que contém o gene que codifica a Integrase 13 sob controle do promotor forte TP2 (pBS1C-TP2-INT13-sfGFP)

O promotor TP2 foi adicionado ao plasmídeo pBS1C-SP130-INT13-sfGFP, substituindo o promotor SP130, através da reação de PCR na qual o primer reverso carregou a sequência do mesmo, além do sítio de restrição da enzima *XbaI*. Tanto o primer direto como o reverso adicionaram o sítio da enzima de restrição *SfiI*. O produto da PCR foi purificado diretamente do gel de agarose 1% (m/v) e então digerido pela enzima *SfiI*. Posteriormente, o plasmídeo foi circularizado através da ligação com a T4 DNA Ligase das extremidades resultantes da digestão pela *SfiI* e então usado para transformar *E. coli* TOP10.

Os plasmídeos obtidos na transformação de *E. coli* TOP 10 foram extraídos e digeridos pelas enzimas *XbaI* e *XhoI* a fim de realizar o teste prévio da clonagem e selecionar quais plasmídeos seriam sequenciados. O plasmídeo positivo foi usado (1.500 ng) para transformar *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* KO7 *lacA::P_{veg}*-Operon14-15. As transformações foram confirmadas através do sequenciamento da PCR de colônia das colônias fluorescentes sob luz azul resultantes do processo.

3.4.4. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes induzido por Quórum Sensing – SLP(+).*P_{srfA}*

3.4.4.1. Construção do pBS1C-P_{srfA}-INT13-sfGFP

A fim de preparar o plasmídeo pBS1C que contém o gene da Integrase13 para a adição do promotor P_{srfA}, o plasmídeo pBS1C-SP130-INT13 foi amplificado por PCR de forma que os sítios CRE, assim como o promotor SP130, foram removidos e os primers adicionaram os sítios de restrição das enzimas *Sfi*I e *Xba*I. A sequência do promotor P_{srfA} foi obtida através da PCR do DNA genômico da bactéria *B. subtilis* 168 na qual os primers também adicionaram os sítios destas enzimas.

Portanto, tanto o plasmídeo como o promotor foram digeridos pela *Sfi*I e *Xba*I. Ambos foram ligados pela T4 DNA Ligase na proporção 1:50 (plasmídeo: inserto). O plasmídeo resultante da ligação foi inserido em *E. coli* TOP10 por transformação por choque térmico. Os plasmídeos extraídos das colônias resultantes da transformação foram sequenciados e o plasmídeo positivo (1.500 ng) usado para transformar *B. subtilis* KO7 *lacA::P_{veg}-Operon14-15*. A transformação foi confirmada pelo sequenciamento da PCR do DNA genômico das colônias resultantes da transformação.

3.4.5. Predição das taxas de tradução dos genes que compõem o Sistema de Lise Programada

A taxa de tradução dos genes 14 e 15 e do gene que codifica a Integrase 13 foi predita in silico através do *Ribosome Binding Site (RBS) Calculator* (https://salislab.net/software/predict_rbs_calculator). (Salis, 2011). Este método calcula a Energia Livre de Gibbs da ligação entre o Ribossomo e o seu sítio de ligação (RBS) e correlaciona a alteração desta energia com a taxa de iniciação da tradução da proteína codificada pelo gene (Salis; Reis, 2020). Desta forma, foi fornecida como entrada a sequência do mRNA resultante de cada unidade de transcrição e, com isso, o *software* gerou a taxa de tradução para cada códon inicial.

Além disso, utilizando o *RBS Calculator* e o *software Benchling*, foram simuladas algumas alterações nas sequências adjacentes aos RBSs dos genes 14 e 15 com intuito de aumentar a taxa de tradução dos mesmos. A partir disso,

foi proposta a deleção de 2 e de 3 nucleotídeos na região 5'-UTR dos genes 14 e 15 respectivamente, sendo que estes nucleotídeos estavam localizados próximos ao RBS dos dois genes.

A unidade de transcrição do Operon14-15 contendo as duas mutações foi obtida na forma de *gBlock* (*Twist Bioscience*) e clonada no plasmídeo integrativo pBS2E. Além disso, foi obtido um plasmídeo contendo o Operon14-15 apenas com a deleção dos 3 nucleotídeos na região 5'-UTR do gene 15. Este plasmídeo foi obtido por mutação sítio-dirigida. As metodologias para as duas construções estão descritas a seguir. Em ambas as construções, os genes que compõe o Operon continuam no sentido reverso ao promotor P_{veg} que controla sua transcrição e flanqueados pelos sítios de reconhecimento da Integrase 13.

3.4.6. Construção dos plasmídeos contendo as mutações nas sequências 5'-UTR dos genes 14 e 15

3.4.6.1. Construção do plasmídeo contendo apenas a deleção dos nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15 (pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação15)

O plasmídeo pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_deleção15 consistiu no plasmídeo contendo a deleção de 3 nucleotídeos na sequência 5'UTR do gene 15. A deleção foi realizada através da mutação sítio-dirigida (Bachman, 2013). Os primers utilizados para realizar a mutação sítio-dirigida foram gerados pelo *software PrimerX* (<https://www.bioinformatics.org/primerx/>). Para isto, a sequência do plasmídeo a ser mutado foi adicionada como entrada no *PrimerX*, assim como a posição dos 3 nucleotídeos que seriam deletados. Com isso, o *software* gerou os primers que foram adicionados na reação de PCR para a mutação. O protocolo da reação de PCR para a mutação e o programa utilizado no termociclador foram os mesmos que os descritos para a Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific™).

Após a PCR, foi adicionado 1 μ L da enzima *DpnI* a reação, a qual foi incubada a 37°C durante 1h. Em seguida, foi realizada a transformação de *E.*

coli TOP10 com 2 µL de plasmídeo resultante da mutação. Com isso, os plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* TP10 obtidas na transformação foram sequenciados a fim de confirmar a mutação sítio-dirigida. Além disso, o plasmídeo positivo foi digerido pelas enzimas *Xba*I e *Spe*I com a finalidade de conferir se estava do tamanho esperado (análise por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v)).

Foram preparadas células competentes das linhagens de *B. subtilis* KO7 *amyE*::Integrase 13 controlado pelo promotor TP2 e responsiva a Repressão Catabólica por Carbono e da linhagem que contém este gene controlado pelo promotor autoinduzível *P_{srfA}*. Estas linhagens foram transformadas com 1.500 ng do plasmídeo pBS2E-*P_{veg}*-Operon14-15_ mutação15. A transformação foi confirmada através do sequenciamento da PCR do DNA genômico extraído das colônias resultantes da transformação. Estas duas linhagens permitiram testar e comparar a ativação do sistema quando o mesmo responde à Repressão Catabólica por Carbono e induzido por Quórum Sensing.

3.4.6.2. Construção do plasmídeo contendo as deleções dos nucleotídeos próximos aos RBSs dos genes 14 e 15 (pBS2E-*P_{veg}*-Operon14-15_ mutação 14+15)

A unidade de transcrição do Operon14-15 contendo as deleções nas regiões 5'UTR dos genes 14 e 15 foi comprada na forma de *gBlock*. Com isso, esta sequência foi amplificada por PCR. Posteriormente, o produto da PCR foi digerido pelas enzimas de restrição *Eco*RI e *Pst*I. O plasmídeo integrativo pBS2E também foi digerido pelas mesmas enzimas. Com isso, foi realizada a ligação entre o plasmídeo e a unidade de transcrição do Operon14-15 com as deleções, na proporção 1:3 (plasmídeo: inserto). O plasmídeo resultante da ligação foi inserido em *E. coli* TOP10 quimicamente competente através da transformação por choque térmico.

Os plasmídeos extraídos da *E. coli* TOP10, após o processo de transformação por choque térmico, foram digeridos pelas enzimas *Eco*RI e *Pst*I e sequenciados. Com isso, 1.500 ng do plasmídeo pBS2E-*P_{veg}*-Operon14-15_ mutação14+15 foi inserido na linhagem de *B. subtilis* KO7 que contém o gene

da Integrase13 sob controle do promotor TP2 e responsiva a Repressão Catabólica por Carbono. A transformação foi confirmada pela PCR do DNA genômico extraído das colônias resultantes da transformação.

3.4.7. Validação dos Sistemas de Lise Programada

3.4.7.1. Sistema de Lise Programada responsivo a Repressão Catabólica por Carbono

A validação do Sistema de Lise Programada responsivo a Repressão Catabólica por Carbono consistiu no cultivo das linhagens que possuem o Sistema de Lise Programada completo (SLP), ou seja, contém as unidades de transcrição do gene da Integrase 13 sob controle da Repressão Catabólica por Carbono, do gene que codifica a proteína repórter *sfGFP* e do Operon14-15 cujo sentido está na fita reversa ao promotor que controla sua transcrição, sendo que todas estão integradas no genoma da bactéria. Além disso, também foi cultivado um controle negativo. Esta linhagem apresenta apenas as unidades de transcrição do gene da Integrase 13 e do gene repórter *sfGFP* integrados ao seu genoma. Portanto, ela apresenta o Sistema de Lise Programada Incompleto (SLPI) e produz a *sfGFP* no meio intracelular. Foi desenvolvido um controle negativo para cada promotor testado.

A fim de avaliar o crescimento, a produção da proteína repórter e a funcionalidade do Sistema de Lise Programada, as linhagens foram cultivadas em meio MP (extrato de levedura 1 g/L, NaNO₃ 25 g/L, KH₂PO₄ 0,333 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,15 g/L, CaCl₂ 0,0075 g/L, MnSO₄.H₂O 0,006 g/L, FeSO₄.7H₂O 0,006 g/L, Na₂HPO₄.12H₂O 0,1% (v/v), pH 7,0) e LB. Os meios foram suplementados com glicose 3% ou 0,5% (m/v).

Para o cultivo em LB, as linhagens, que estavam estocadas em ultrafreezer a -80°C, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio suplementado com glicose 6% (m/v), cloranfenicol 5 µg/mL e eritromicina 1 µg/mL (para o controle negativo o antibiótico adicionado foi apenas o cloranfenicol 5 µg/mL). As bactérias foram incubadas a 37°C e 220 rpm durante 15h. Após este período, estes cultivos foram usados para inocular tubos de

ensaio contendo 6 mL de LB suplementados com glicose 3% ou 0,5% (m/v) sem antibiótico. O volume de inóculo foi calculado para que as culturas iniciassem com densidade ótica a 600nm (DO₆₀₀) igual a 0,05.

Para o cultivo em MP, as linhagens também foram inoculadas diretamente do estoque a -80°C em 5 mL de LB suplementado com glicose 6% (m/v), cloranfenicol 5 µg/mL e eritromicina 1 µg/mL (no cultivo do controle negativo não foi adicionado eritromicina) e incubadas a 37°C e 220 rpm. Após 15h, 100 µL destes cultivos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de MP suplementado com glicose 6% (m/v), cloranfenicol 5 µg/mL e eritromicina 1 µg/mL (para o controle negativo foi mantido apenas o cloranfenicol) e incubados a 37°C e 220 rpm durante 15h. Esta etapa teve como objetivo adaptar as linhagens ao MP antes do início do cultivo uma vez que estas foram estocadas em LB. Com isso, as linhagens foram inoculadas a DO₆₀₀ de 0,05, em tubos de ensaio com 6 mL de MP suplementado com glicose 3% ou 0,5% (m/v) sem antibiótico.

Com relação à validação do SLP contendo as deleções nos nucleotídeos adjacentes às regiões RBS dos genes 14 e 15, os inóculos foram inicialmente cultivados em placas de LB suplementado com 6% (m/v) de glicose, por um período de 12 horas. Posteriormente, foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio MP suplementado com 6% (m/v) de glicose e incubados a 37 °C, sob agitação de 220 rpm, por 7 horas. Em seguida, o cultivo foi ajustado para uma DO₆₀₀ de 0,05 em tubos de ensaio contendo 6 mL de meio MP suplementado com 3% (m/v) de glicose, isento de antibiótico. Todos os cultivos foram realizados em triplicata biológica (foram cultivadas 3 colônias de cada linhagem) e incubados a 37°C e 220 rpm. Foram retiradas amostras durante o cultivo e, a cada amostra retirada, foram analisados o crescimento (DO₆₀₀) e a fluorescência do meio de cultivo e das células nos comprimentos de onda respectivos da *sfGFP* (excitação a 485nm e emissão a 535nm) (Overkamp et al., 2013). Para a determinação da fluorescência, as células e o meio de cultivo foram separados por centrifugação (17.000 x g, 20 min, a 4°C). Em seguida, as células foram ressuspensas em solução salina 1% (m/v), sendo a DO₆₀₀ padronizada entre as triplicatas. A fluorescência foi normalizada pela DO₆₀₀ e tomada como medida

para a comparação entre a *sfGFP* intracelular e a extracelular (fluorescência do meio de cultivo).

Tanto para os cultivos em LB quanto em MP, foram realizadas PCRs com DNA genômico extraído das células após 48 horas de cultivo. O objetivo das PCRs foi identificar se o Operon14-15 teve seu sentido invertido pela Integrase 13 no DNA. Para isto, as PCRs foram realizadas com dois pares de primers, um desses pares gera produto se o Operon14-15 foi recombinado (flipado), enquanto o outro par gera produto apenas se o Operon14-15 não foi recombinado (não flipado).

Para garantir que haveria um número suficiente de células viáveis para a extração do gDNA, no ponto de 48h, 300 µl dos cultivos foram inoculados em tubos de ensaio com 6 mL do meio de cultivo (LB ou MP) com glicose 6% e incubados a 37°C durante 16h. A extração do gDNA das células resultante do ponto de 48h foi realizada a partir deste cultivo. Como a atividade de recombinação da Integrase 13 não é reversível, o novo cultivo ainda deve refletir qualquer alteração genômica existente ao final do cultivo anterior.

3.4.7.2. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes induzido por Quórum Sensing – SLP(+).P_{SrfA}

As linhagens de *B. subtilis* que contêm o Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes Induzido por Quórum Sensing completo (SLP) e seu controle negativo (SLPI) a qual produz *sfGFP* no meio intracelular foram cultivadas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). Nesta variação do sistema, o promotor P_{veg} continua controlando a expressão do Operon14-15 e o P_{SrfA} controla a expressão do gene que codifica a Integrase 13.

Para o cultivo, as células foram inicialmente inoculadas, a partir do estoque a -80°C, em tubos de ensaio com 5 mL de MP suplementado com glicose 6% (m/v) e cloranfenicol 5 µg/mL e eritromicina 1 µg/mL (no cultivo do controle negativo, o único antibiótico adicionado foi cloranfenicol 5 µg/mL). As células foram mantidas a 37°C durante 7h. Esta pré-cultura foi realizada diretamente em MP e incubada por menos tempo que nos cultivos das demais

linhagens, com o objetivo de evitar que as bactérias alcancem a transição entre as fases exponencial e estacionárias já na pré-cultura, o que causaria a ativação precoce do sistema. Após as 7h de incubação, as células foram centrifugadas (17.000 xg, a 4°C durante 10min) e ressuspensas em 1 mL de MP com glicose 6% (m/v).

A lavagem com meio fresco teve como finalidade evitar que o ComX, peptídeo-sinal que atua na indução do promotor, fosse carregado ao cultivo uma vez que é exportado para o meio extracelular, o que poderia levar a ativação precoce do sistema (Xu *et al.*, 2021). Em seguida as células foram inoculadas em tubos de ensaio com 6 mL de MP suplementado com glicose 3% (m/v). O volume de inóculo foi calculado para que os cultivos iniciem com a DO600 de 0,05. Todos os cultivos foram realizados em triplicata biológica e as medidas de crescimento, produção e exportação de *sfGFP* e PCRs do DNA genômico foram realizadas como anteriormente.

3.4.8. Cultivo em Pioreactor

A linhagem contendo o Sistema de Lise Programada completo, responsivo ao Sistema de Repressão Catabólica por Carbono, com os promotores fortes TP2 e P_{veg} , e portadora da deleção dos 3 nucleotídeos na região adjacente ao RBS do gene 15, assim como o controle negativo, foram cultivadas em Pioreactor. O Pioreactor é um mini biorreator, com volume máximo de 20 mL e volume útil de 15 mL, controlado por uma placa Raspberry Pi (García *et al.*, 2025).

A escolha do cultivo em Pioreactor se deve ao fato de que este fornece leituras de DO600, taxa de crescimento específica (h^{-1}) e densidade óptica normalizada (DO600/DO600 inicial), em tempo real, ao longo de todo o cultivo. Além disso, o objetivo deste cultivo foi avaliar a ativação do Sistema de Lise Programada em diferentes condições de cultivo, visando a otimização do sistema. Para tal, o preparo do inóculo foi realizado da mesma forma que a descrita no item 3.9.4. As linhagens foram inoculadas em Pioreactors contendo 14 mL de MP suplementado com glicose 3% (m/v). O volume de inóculo foi

calculado de modo a iniciar os cultivos com DO600 igual 0,05. Foram coletadas amostras no início do cultivo (0h) e após 24 e 48 horas de cultivo para serem realizadas leituras de DO600, fluorescência das células e do meio de cultura em leitora de microplacas, além da quantificação de açúcares redutores por DNS.

3.4.9. Análise Estatística

Foram realizadas análises estatísticas dos valores máximos de fluorescência intra- e extracelular, da DO600 e da concentração de glicose (g/L) em todos os cultivos. Para isto, foi aplicado o *software* JASP (Jeffreys's Amazing Statistics Program) (Love et al., 2019; Ahour, 2024). No JASP, foram executadas análises descritivas por meio do teste de Shapiro–Wilk, seguidas da aplicação de ANOVA e dos testes post-hoc de Tukey (para dados paramétricos) e Games–Howell (para dados não paramétricos), adotando-se nível de significância de 0,05. O teste de Shapiro–Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados, enquanto a ANOVA indicou a existência de diferenças estatísticas entre os grupos (Monter-Pozos; Gonzáles-Estrada, 2024; Agbangba *et al.*, 2024). Adicionalmente, o teste de Levene foi aplicado para avaliar a homogeneidade das variâncias entre os grupos (Katsileros, *et al.*, 2023). Por fim, os testes de Tukey e Games–Howell foram empregados para identificar diferenças específicas entre os grupos experimentais (Agbangba *et al.*, 2024).

4. Resultados

O Sistema de Lise Programada (SLP) foi proposto com o objetivo de gerar a lise celular após a bactéria atingir os níveis máximos de crescimento e produção da biomolécula de interesse, liberando todo o conteúdo intracelular inclusive a proteína alvo. Durante este trabalho, foram construídas e testadas variações deste sistema a fim de fazer com que este se torne funcional e eficiente. Para a validação do SLP, a Proteína Verde Fluorescente *sfGFP* (*superfolder Green Fluorescent Protein*) foi escolhida como repórter devido à sua facilidade de detecção e quantificação (Guiziou *et al.*, 2016).

Este trabalho foi desenvolvido com base no ciclo de design-construção-teste-aprendizado característico da Biologia Sintética (Foo, *et al.*; 2023). Primeiramente foi realizado o design do Sistema de Lise Programada, com a determinação das partes que o compõem e de suas variações. Com isso, o sistema foi construído e testado e, de acordo com os resultados gerados pelos testes, foi necessário o desenvolvimento de novos ciclos de design-construção-teste-aprendizado a fim de realizar ajustes nos sistemas.

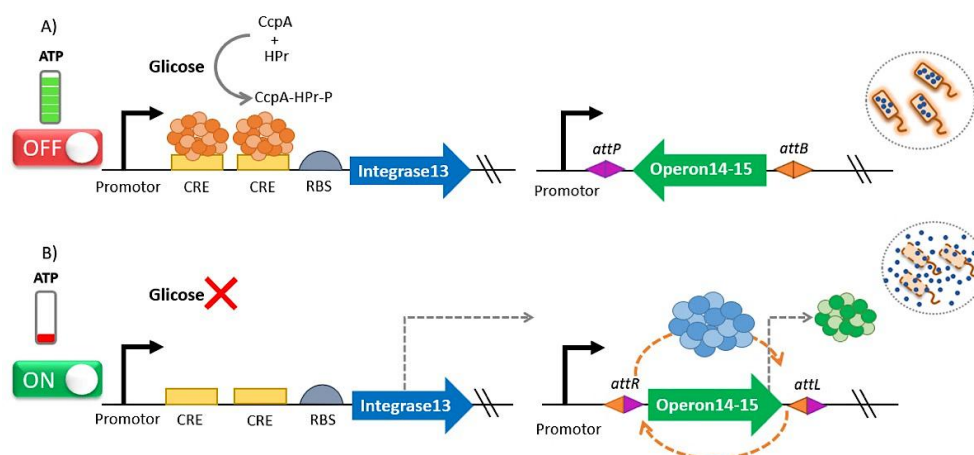
As principais diferenças entre as variações do SLP consistiram na regulação da expressão do gene que codifica a Integrase 13. Duas destas tiveram como base a Repressão Catabólica por Carbono (Figura 6). Ou seja, a expressão do gene que codifica a Integrase 13 é regulada pela disponibilidade da fonte preferencial de carbono que, para *B. subtilis*, é a glicose. Dessa forma, a Integrase 13 passa a ser sintetizada após a glicose ser exaurida do meio de cultivo. Foi construída uma variação do Sistema de Lise Programada composta por dois promotores fracos para *B. subtilis* e outra contendo dois promotores fortes para esta bactéria.

Os promotores fracos e constitutivos escolhidos para controlar a expressão dos genes que codificam a Integrase 13 e o Operon14-15 foram o SP130 e o SP133, respectivamente. Estes dois promotores são sintéticos e foram desenvolvidos e testados por Liu *et al* (2018). O critério para a escolha destes promotores consistiu na necessidade de evitar o vazamento da expressão do gene da Integrase 13, que poderia causar a lise precoce da célula. Além disso, procurou-se evitar que os genes do Operon14-15 fossem expressos

a altas taxas, permitindo que assim a produção da biomolécula pelo maior tempo possível antes da lise.

Considerando a possibilidade de que os promotores fracos pudessem fazer com que a taxa de expressão dos genes que compõem o sistema fosse muito baixa para gerar a resposta esperada, foi construída uma variação do SLP na qual os promotores fracos SP130 e SP133 foram substituídos pelos promotores constitutivos e fortes para *B. subtilis* TP2 e P_{veg} , respectivamente (Guiziou *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Isto teve como objetivo aumentar a taxa de expressão do gene que codifica a Integrase 13 e dos genes do Operon14-15.

Figura 6 - Sistema de lise programada responsivo a Repressão Catabólica por Carbono.



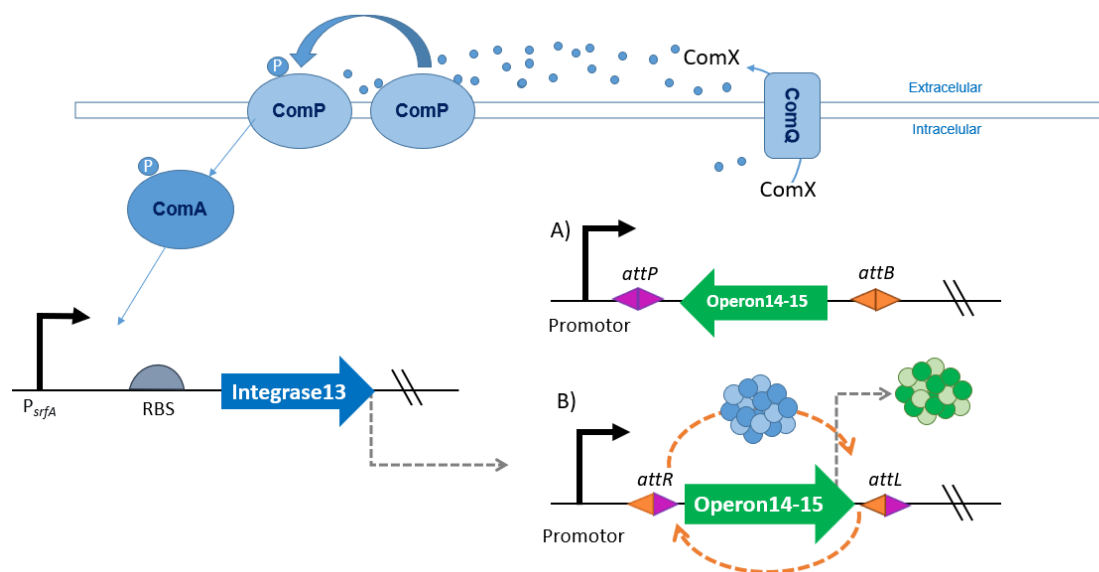
Fonte: Autora (2021).

A) A presença da fonte de carbono preferencial mantém alta concentração de ATP nas células. Assim, o fator de transcrição CcpA interage com a proteína Hpr fosforilada, que liga-se ao sítio CRE, reprimindo a expressão do gene que codifica a Integrase 13. Dessa forma, os genes do Operon14-15 permanecem no sentido reverso, impedindo a expressão e consequente lise celular. **B)** Quando a fonte de carbono é exaurida, a concentração de ATP é reduzida e o AMP se acumula, levando a CcpA a se desligar do sítio CRE, liberando a produção da Integrase 13. Esta, por sua vez, realiza a recombinação dos sítios *att* invertendo o sentido dos genes do Operon14-15, promovendo o rompimento celular.

Além disso, foi construído um processo alternativo de indução da expressão do gene da Integrase 13 (Figura 7), usando o promotor P_{srfA} . O P_{srfA} também é forte para *B. subtilis*, mas só é ativado ao final da fase exponencial de crescimento, sendo induzido pelo sistema natural de Quórum Sensing em *B.*

subtilis (Xu *et al.*, 2021). Neste sistema, a regulação do Operon14-15 também foi realizada pelo promotor forte constitutivo P_{veg} (Liu *et al.*, 2018). A seguir, estão descritas as estratégias de construção dos plasmídeos que compõem o Sistema de Lise Programada.

Figura 7 - Sistema de lise programada responsivo ao Quórum Sensing.



Fonte: Autora (2025).

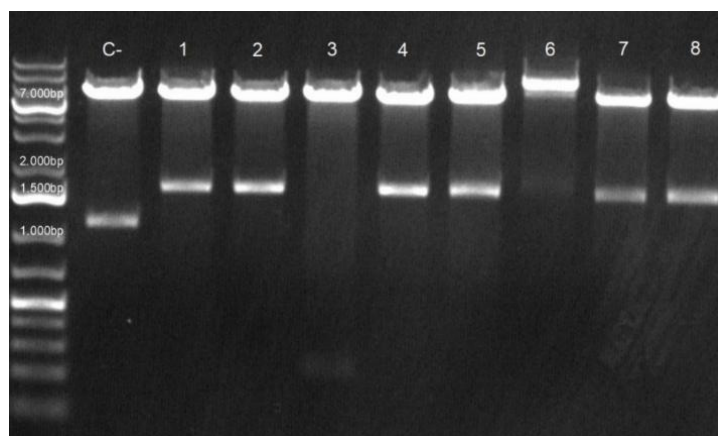
- A)** Quando a concentração de células e de ComX é baixa, a molécula ComA está na sua forma não fosforilada e, com isso, a expressão do gene da Integrase 13 está inativada. Dessa forma, o Operon14-15 está codificado na fita oposta ao promotor que controla sua transcrição. **B)** Após o cultivo atingir a alta densidade celular e o peptídeo-sinal ComX atingir a concentração crítica, a molécula ComP se autofosforila e então transfere o grupo fosfato para a molécula ComA, a qual se liga ao promotor P_{srfA} ativando a expressão do gene que codifica a Integrase 13. Esta enzima recombina os sítios att, invertendo o sentido do Operon14-15 o qual passa a ser codificado no mesmo sentido do seu promotor. Isto ativa a produção das enzimas líticas as quais irão romper as células liberando o conteúdo intracelular.

4.1. Sistema de Lise Programada com Promotores Fracos responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(-)

4.1.1. Construção do plasmídeo que contém o Operon14-15 sob controle do promotor fraco SP133 (pBS2E-SP133-Operon14-15)

As digestões dos plasmídeos 1, 2, 4, 5, 7 e 8 (Figura 8), extraídos das colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com o produto da ligação entre o vetor pBS2E e a unidade de transcrição do Operon14-15, geraram fragmentos dos tamanhos esperados para a clonagem positiva 6.217 pb e 1.582. Além disso, a digestão do controle negativo apresentou o padrão esperado 6.217 pb e 1.110 pb. Dessa forma, os plasmídeos 1, 2 e 4 foram selecionados para posterior análise por sequenciamento.

Figura 8 - Clonagem do Operon14-15 no pBS2E.



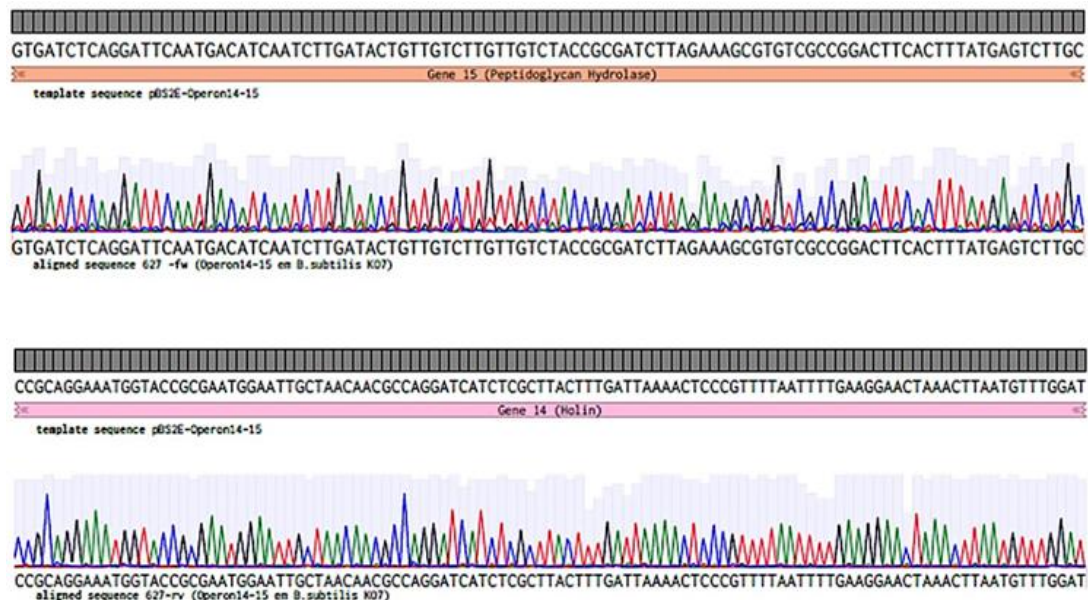
Fonte: Autora (2022).

Eletróforese em gel de agarose dos plasmídeos digeridos pela *EcoRI* e *PstI*. Na figura, C- representa o controle negativo da clonagem e os números de 1 a 8 são os plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* TOP10 resultantes do processo de clonagem.

Com base nos resultados obtidos por sequenciamento, a colônia 4 foi estocada e seu plasmídeo foi inserido em *B. subtilis* KO7. Como o plasmídeo extraído de *E. coli* TOP10 foi o mesmo que o inserido em *B. subtilis* KO7, será apresentado o alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E-SP133-Operon14-15 e a fornecida pelo sequenciamento do produto da PCR de colônia da *B. subtilis* KO7 transformada (Figura 9). Esse alinhamento, além de confirmar a presença do inserto em *B. subtilis*, também valida a clonagem realizada em *E. coli* TOP10. Os resultados demonstraram que a inserção do Operon14-15 no vetor pBS2E foi bem-sucedida, e também que a recombinação em *B. subtilis* foi

obtida, resultando na geração da linhagem *B. subtilis*::SP133-Operon14-15.

Figura 9 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E-SP133-Operon14-15 e a resultante do sequenciamento.



Fonte: Alinhamento realizada pela autora no *Benchling* (2023).

A figura representa o alinhamento da sequência do pBS2E-SP133-Operon14-15 com o resultado do sequenciamento da PCR de colônia da *B. subtilis* KO7 transformada. Em laranja está representado o gene 15 e, em rosa, está o gene 14.

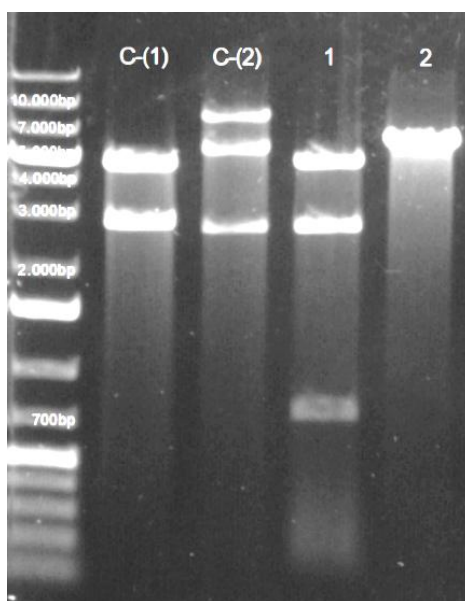
4.1.2. Construção do plasmídeo que contém o gene que codifica a Integrase 13 sob controle do promotor fraco SP130 (pBSIC-SP130-INT13)

A primeira estratégia de construção do pBS1C-SP130-INT13 não foi bem-sucedida, uma vez que não houve crescimento da *E. coli* TOP10 após a transformação com o plasmídeo resultante da ligação com o promotor SP130 e o gene que codifica a Integrase 13. Foram realizadas diversas tentativas de digestão e ligação entre as três partes, alterando o tempo de incubação com as enzimas de restrição, e as proporções entre as partes na ligação. Entretanto, nenhuma das abordagens resultou no crescimento de colônias de *E. coli* TOP10 após o processo de transformação o que levou a adoção da segunda estratégia.

Dentre as digestões dos plasmídeos extraídos de duas colônias de *E. coli* TOP10 resultantes do processo de adição do promotor SP130 e os sítios

CRE ao pBS1C, que já continha o gene que codifica a Integrase 13, através da clonagem por etapas, apenas o plasmídeo número 1 apresentou as bandas do tamanho esperado 4.499 pb, 2.572 pb e 734 pb (Figura 10).

Figura 10 - Clonagem do gene que codifica a Integrase 13 no pBS1C.

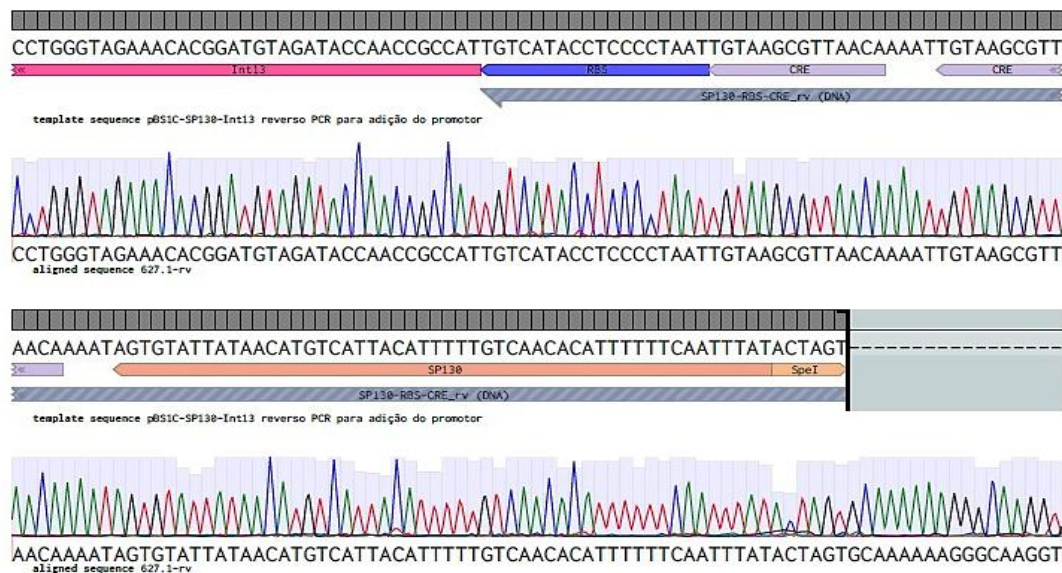


Fonte: Autora (2023).

Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos digeridos pela *SpeI* e *Eco31I*. C-(1) consiste na digestão do plasmídeo pBS1C sem inserto, C-(2) representa a digestão do pBS1C contendo o gene que codifica a Integrase 13, porém sem o promotor e o sítio CRE. Dos números 1 ao 2 estão representadas as digestões dos plasmídeos extraídos das duas colônias de *E. coli* resultantes da clonagem do gene da Integrase sob controle do promotor SP130 e dois sítios CRE.

Ademais, é possível observar que as digestões dos controles resultaram em fragmentos dos tamanhos esperados: 4.493 pb e 2.681 pb para o plasmídeo sem inserto e 5.148 pb e 2.572 pb para o plasmídeo com o gene que codifica a Integrase 13 sem o promotor e os sítios CRE. A seguir, o plasmídeo número 1 foi confirmado por sequenciamento (Figura 11).

Figura 11 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C-SP130-INT13 e a resultante do processo de clonagem em *E. coli* TOP10.



Fonte: Alinhamento realizado pela autora no *Benchling* (2023).

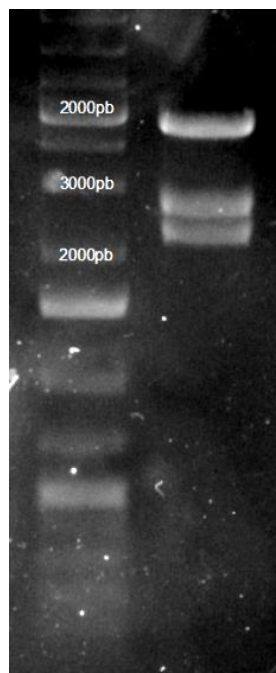
Em rosa está representado o gene da Integrase, em azul o RBS R0, em roxo claro estão os dois sítios CRE e em laranja o promotor SP130.

O alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C-SP130-INT13 e a resultante do sequenciamento realizado após a transformação de *E. coli* TOP10 foi bem-sucedido. Isto demonstra que o processo de clonagem funcionou, o que permitiu que o trabalho avançasse para a adição do gene repórter ao plasmídeo.

4.1.3. Construção do plasmídeo contendo o gene repórter

A Figura 12 demonstra o resultado da digestão do plasmídeo pBS1C-SP130-INT13-sfGFP extraído de *E. coli* TOP10 para confirmação do tamanho do mesmo.

Figura 12 - Clonagem do gene repórter da *sfGFP*.

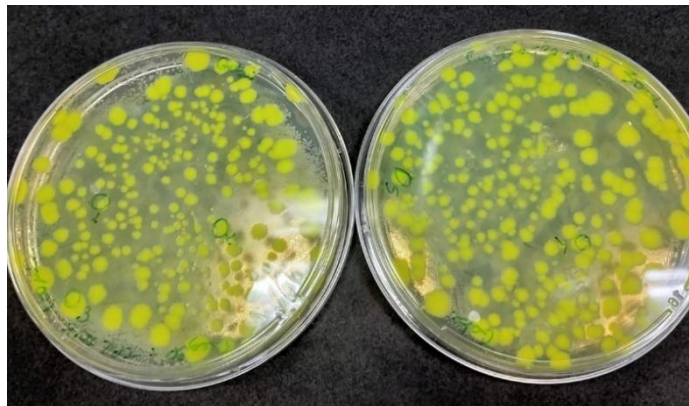


Fonte: Autora (2023).

Digestão do pBS1C-SP130-INT13-*sfGFP* pelas enzimas *Bsal* e *SpeI*. Os fragmentos apresentaram os tamanhos esperados de 4.475 pb, 2.572 pb e 2.197 pb.

Os fragmentos gerados pela digestão com as enzimas *Bsal* e *SpeI* apresentaram os tamanhos esperados, 4.475 pb, 2.572 pb e 2.197 pb. Dessa forma, foi concluído que a a adição do gene repórter ao plasmídeo foi bem-sucedida. A Figura 13 apresenta as placas resultantes da inserção do pBS1C-SP130-INT13-*sfGFP* em *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* KO7::SP133-Operon14-15.

Figura 13 - Colônias de *B. subtilis* KO7 transformadas pelo plasmídeo pBS1C- SP130-INT13-sfGFP.



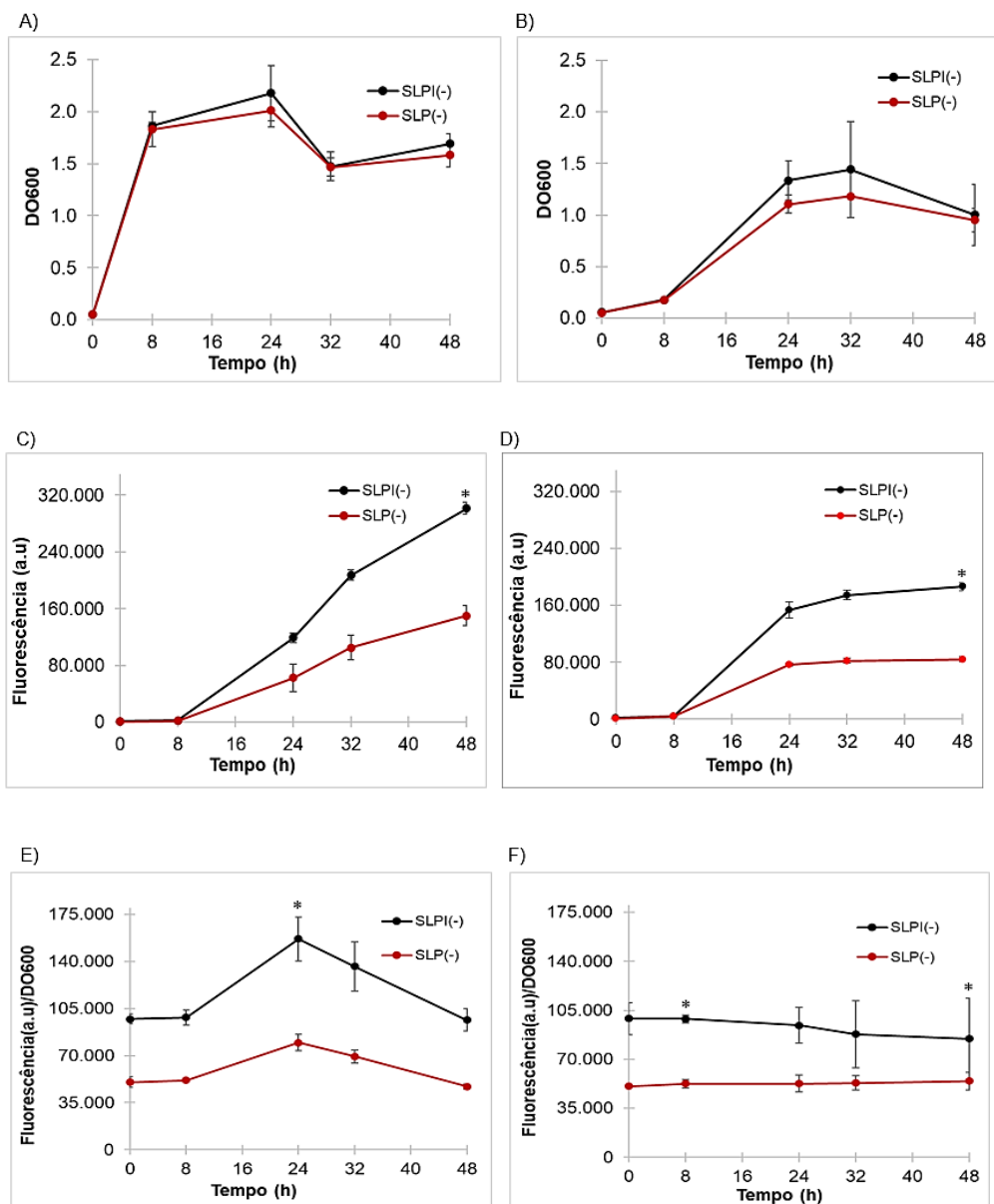
Fonte: Autora (2023).

Todas as colônias resultantes da transformação das linhagens *B. subtilis* KO7 ficaram verdes. A possibilidade de visualizar a cor verde mesmo na ausência da luz UV indica que as bactérias estão produzindo quantidades elevadas de sfGFP, o que demonstra que mesmo o gene repórter estando em apenas uma cópia no genoma das bactérias, o mesmo está sendo expresso em altas taxas.

4.1.4. Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fracos responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(-)

Nos cultivos realizados em LB, o crescimento com glicose 3% (m/v) foi superior ao à 0,5% (m/v), como esperado (Figura 14A e 14B). Também se observa que as culturas atingiram o crescimento máximo após 24 h de cultivo em glicose 3% (m/v) e após 32h em glicose 0,5%.

Figura 14 - Cultivo das linhagens SLPI(-) e SLP(-) em LB.



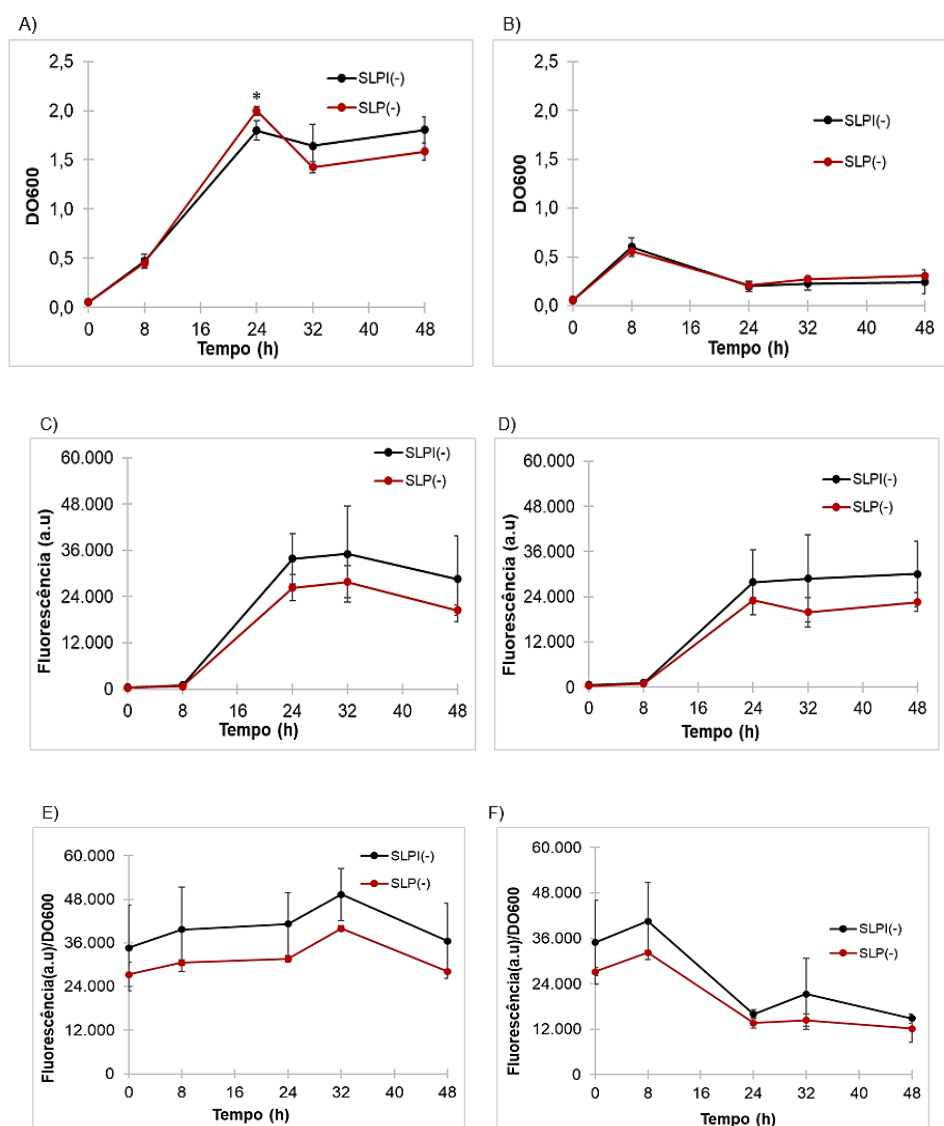
Fonte: Autora (2023).

A), C) e E) representam cultivos em LB + glicose 3% (m/v). **B), D) e F)** representam cultivos em LB + 0,5% (m/v). **A) e B)** Crescimento medido pela DO₆₀₀. **C) e D)** Fluorescência do meio do cultivo gerada pela produção e liberação de sfGFP. **E) e F)** Fluorescência/DO₆₀₀ das células de *B. subtilis* resultantes da sfGFP intracelular. SLP(-) e SLPI(-) referem-se às linhagens com o sistema completo (vermelho) e incompleto (preto), respectivamente, sob controle de promotores fracos (-). Foram realizadas análises estatísticas nos pontos máximos de cada gráfico, dessa forma os pontos estatisticamente diferentes estão marcados com “*”.

Os valores de fluorescência do meio de cultivo e fluorescência/DO600 das células (Figura 14E e 14F) do controle negativo SLPI(-) foram superiores aos valores do sistema completo SLP(-), tanto no meio suplementado com 3% quanto com 0,5% (m/v) de glicose. Além disso, a fluorescência do meio de cultivo de SLP(-) começou a aumentar a partir de 8h de cultivo, assim como foi observado para SLPI(-). Isto indica que o sistema não foi funcional e, portanto, não causou a lise celular nos cultivos em meio LB. Os resultados indicam que a fluorescência dos meios dos cultivos é resultado, muito provavelmente, da liberação da *sfGFP* para o meio causada pela morte celular por escassez de nutrientes e não pela ativação do sistema.

Quando cultivadas em meio MP, novamente as linhagens cresceram mais com maior suplementação de glicose (Figura 15A).

Figura 15 - Cultivo das linhagens SLPI(-) e SLP(-) em MP.



Fonte: Autora (2023).

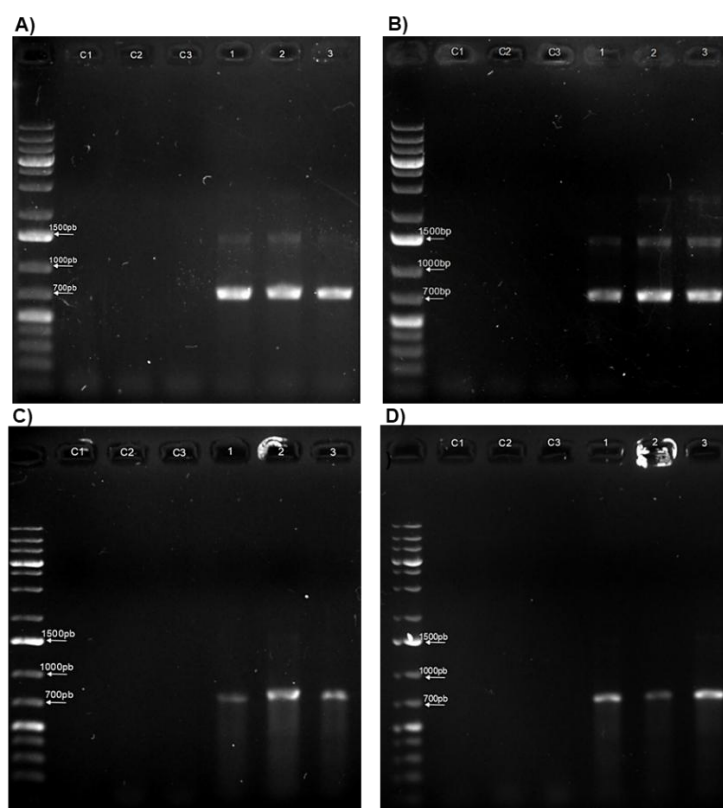
A), C) e E) representam cultivos em MP + glicose 3% (m/v). **B), D) e F)** representam cultivos em MP + 0,5% (m/v). **A) e B)** Crescimento medido pela DO600. **C) e D)** Fluorescência do meio do cultivo gerada pela produção e liberação de sfGFP. **E) e F)** Fluorescência/DO600 das células de *B. subtilis* resultantes da sfGFP intracelular. SLP(-) e SLPI(-) referem-se às linhagens com o sistema completo (vermelho) e incompleto (preto), respectivamente, sob controle de promotores fracos (-). Foram realizadas análises estatísticas nos pontos máximos de cada gráfico, portanto os pontos marcados com (*) são estatisticamente diferentes.

A fluorescência máxima dos meios de cultivo (Figura 15C e 15D) não apresentaram diferença significativa entre si. Também os valores máximos de fluorescência/DO600 das células de SLPI(-) e SLP(-) em não foram significativamente diferentes entre si (Figura 15E e 15F). Portanto, a produção

de *sfGFP* foi parecida entre as linhagens, e o sistema de lise não foi funcional.

Além disto, com base nas reações de PCR realizadas a partir do DNA genômico extraído das células durante o cultivo, buscou-se verificar se houve inversão do sentido do Operon14-15 mediada pela Integrase 13 (Figura 16). Considerando a linhagem contendo o Sistema de Lise Completo, o tamanho esperado do fragmento amplificado é de 1.463 pb, caso o Operon14-15 permaneça em sua orientação original. Por outro lado, caso o operon tenha seu sentido invertido, o produto da PCR deverá apresentar 869 pb.

Figura 16 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA das linhagens *B. subtilis* SLPI(-) e SLP(-).



Fonte: Autora (2023).

A) e B) representam as PCRs do gDNA após o cultivo em LB, **C) e D)** representam as PCRs do gDNA após o cultivo em MP. **A)** cultivo em LB + glicose 3% (m/v). **B)** cultivo em LB + glicose 0,5% (m/v). **C)** cultivo em MP + glicose 3% (m/v). **D)** cultivo em MP + glicose 0,5% (m/v). C1, C2 e C3 representam a linhagem com o sistema incompleto, SLPI(-), e 1, 2 e 3 representam a linhagem com o sistema de lise completo, SLP(-), ambos sob controle de promotores fracos (-). Bandas de tamanho 1.463 pb são negativas para a recombinação, bandas com tamanho 869 pb são positivas para a recombinação.

Após 48h, os cultivos de SLP(-) em LB + glicose 3% (m/v) e LB + glicose 0,5% (m/v) (Figura 16A e 16B) resultaram em células que tiveram o sistema ativado e, com isso, o sentido do Operon14-15 invertido, e também em células nas quais o operon não teve seu sentido invertido, uma vez que as PCRs geraram bandas de ambos os tamanhos. Já os cultivos em MP + glicose 3% (m/v) e MP + glicose 0,5% (m/v) (Figura 16C e 16D) resultaram na ativação do sistema em todas as células cultivadas, pois foi observado apenas o fragmento de 869 pb. Portanto, considerando estes resultados e os resultados referentes aos valores de fluorescência, concluiu-se que a Integrase 13 foi produzida e atuou como o esperado. Essa foi a primeira vez que a atividade Serina Integrase foi confirmada em *B. subtilis*. Entretanto, o sistema não promoveu a lise celular.

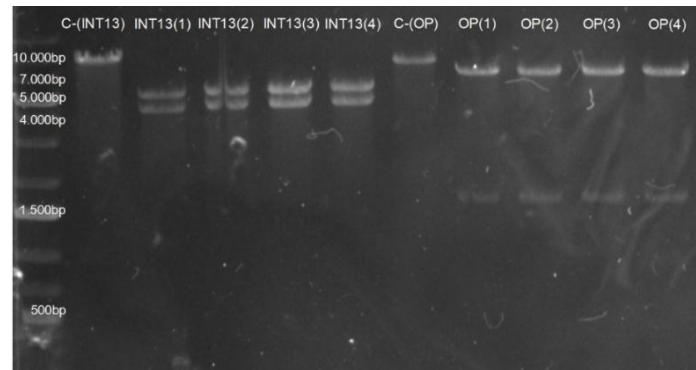
4.2. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(+)

4.2.1. Construção do pBS2E- P_{veg} -Operon14-15 e do pBS1C-TP2-INT13-sfGFP

Todas as reações de digestão realizadas para o teste preliminar da construção dos plasmídeos pBS2E- P_{veg} -Operon14-15 e do pBS1C-TP2-INT13-sfGFP geraram fragmentos de DNA com os tamanhos esperados (Figura 17). Os controles negativos, correspondentes aos plasmídeos pBS1C-SP130-INT13-sfGFP e pBS2E-SP133-Operon14-15, apresentaram bandas de 9.244 pb e 7.799 pb, respectivamente.

Para os plasmídeos recombinantes, foram observadas bandas de 5.063 pb e 4.175 pb no produto da digestão do pBS1C, contendo o gene da Integrase 13 sob controle do promotor TP2 e dois sítios CRE, e de 6.329 pb e 1.519 pb resultante da digestão do pBS2E contendo o Operon14-15 sob controle do promotor P_{veg} . Dessa forma, considerou-se que, possivelmente, os plasmídeos estavam corretos. As colônias correspondentes aos plasmídeos designados como INT13(3) e OP(4) no gel foram estocadas, e a confirmação das construções foi realizada por meio de sequenciamento.

Figura 17 - Construção dos plasmídeos pBS2E-P_{veg}-Operon14-15 e pBS1C-TP2-INT13-sfGFP.

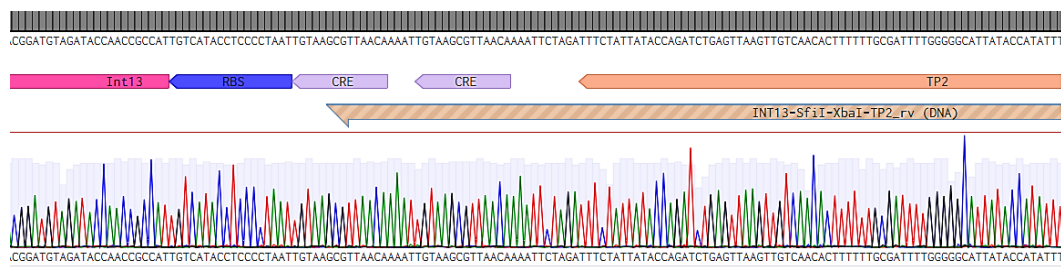


Fonte: Autora (2023).

As amostras INT13(1) e INT13(4) correspondem aos plasmídeos resultantes da substituição do promotor que regula a expressão do gene da Integrase 13, digeridos com as enzimas *XbaI* e *XhoI*. As amostras OP(1) a OP(4) referem-se aos plasmídeos gerados pela troca do promotor responsável pela expressão dos genes do Operon14-15, digeridos com a enzima *SaI*. O controle negativo C-(INT13) corresponde à digestão do plasmídeo pBS1C-SP130-INT13-sfGFP, enquanto C-(OP) refere-se à digestão do plasmídeo pBS2E-SP133-Operon14-15.

Considerando que todas as transformações de *B. subtilis* KO7 com os plasmídeos construídos foram confirmadas por sequenciamento e que os plasmídeos eram os mesmos em todas as etapas, desde o sequenciamento em *E. coli* TOP10, aqui são apresentados os resultados do sequenciamento da linhagem *B. subtilis* KO7 transformada com os dois plasmídeos construídos (pBS2E-P_{veg}-Operon14-15 e do pBS1C-TP2-INT13-sfGFP) (Figuras 18 e 19).

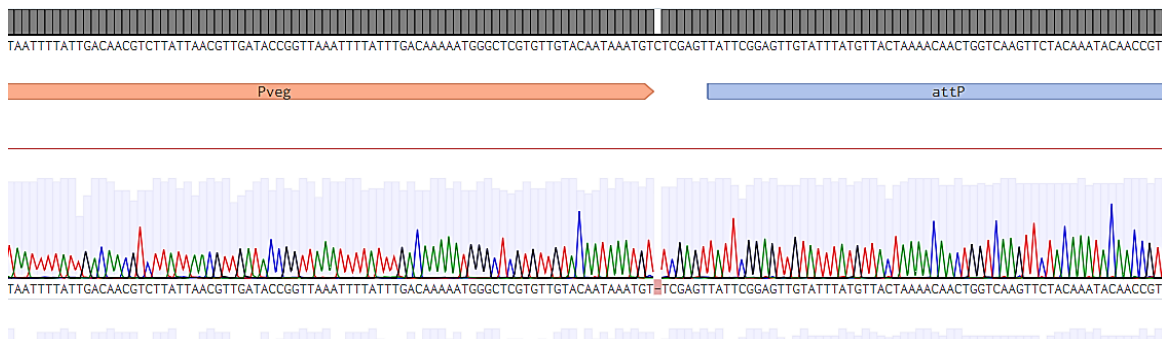
Figura 18 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C-TP2-INT13-sfGFP e a resultante do processo de clonagem.



Fonte: Alinhamento realizado pela autora no *Benchling* (2023).

Em laranja está apresentada a sequência do TP2, seguido pelas sequências dos dois sítios CRE (roxo claro), do RBS (em azul) e do gene que codifica a Integrase 13 do qual o início está representado em rosa.

Figura 19 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E- P_{veg} -Operon14-15 e a resultante do processo de clonagem.



Fonte: Alinhamento realizado pela autora no *Benchling* (2023).

A sequência do promotor P_{veg} está representada em laranja e, em azul, está o início do sítio $attP$.

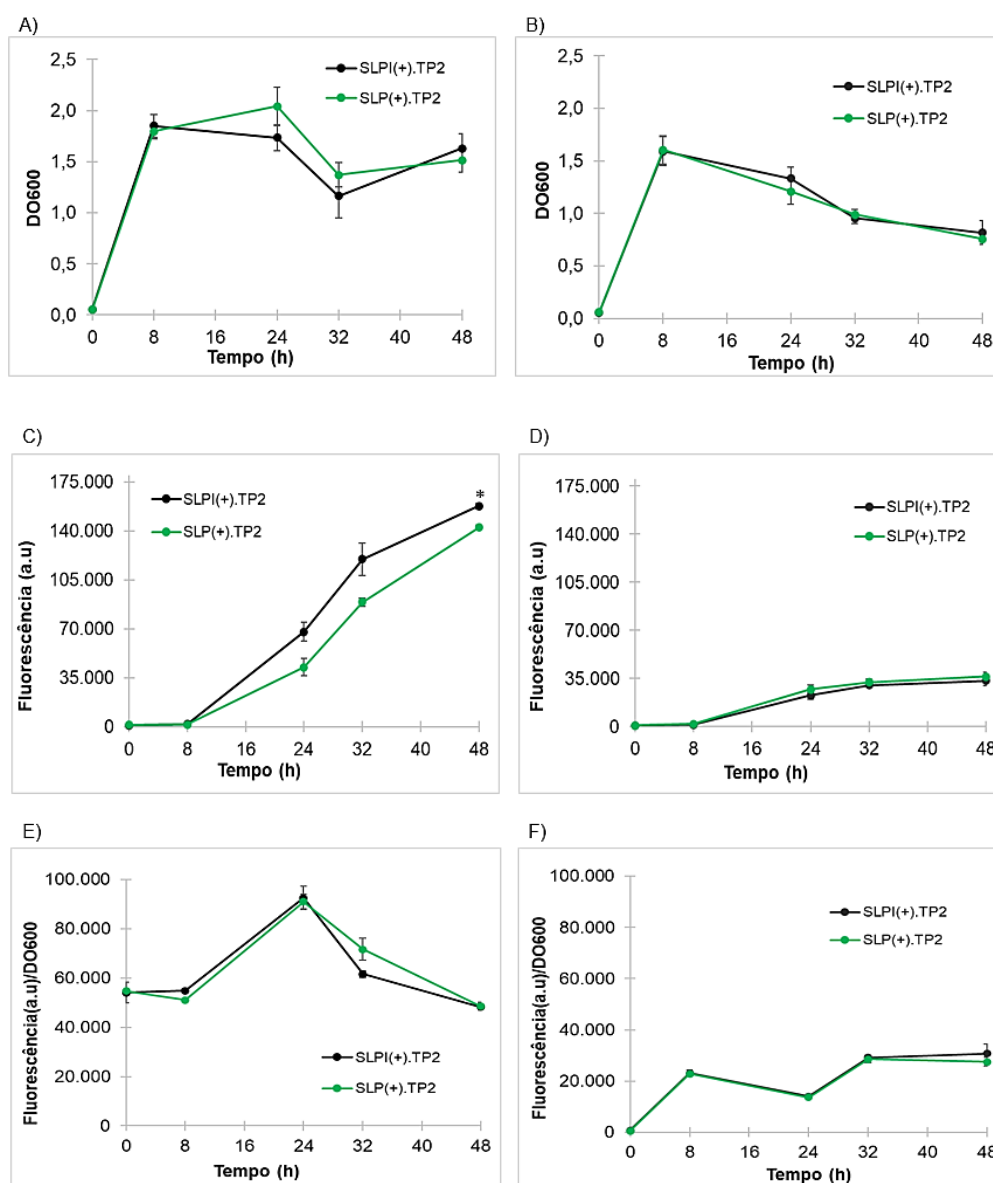
O alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C-TP2-INT13-*sfGFP* e a resultante do processo de adição do TP2 foi bem-sucedido, o que confirmou a clonagem deste promotor no plasmídeo. Além disso, o alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E- P_{veg} -Operon14-15 e a obtida por sequenciamento também demonstrou o sucesso na clonagem do P_{veg} , exceto pela ausência de um nucleotídeo na sequência fornecida pelo sequenciamento. Considerando que este nucleotídeo está localizado no espaçador, entre o promotor e o sítio $attP$, concluiu-se que sua ausência não prejudicaria o correto funcionamento da construção.

Portanto, as duas clonagens foram bem-sucedidas e as linhagens *B. subtilis*::TP2-INT13-*sfGFP* e *B. subtilis*::TP2-INT13-*sfGFP*:: P_{veg} -Operon14-15 foram desenvolvidas. A primeira linhagem produz a *sfGFP* no meio intracelular e foi utilizada como controle negativo do sistema, recebendo a denominação SLPI(+) a qual se refere ao Sistema de Lise Programada Incompleto. Já a segunda, que contém a expressão completa dos elementos do sistema, foi denominada SLP(+), correspondendo ao Sistema de Lise Programada Completo. O sinal (+) indica que os genes estão sob controle de promotores fortes: TP2, responsável pela expressão do gene da Integrase 13, e P_{veg} , que regula a transcrição dos genes do Operon14-15.

4.2.2. Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes responsivo a Repressão Catabólica por Carbono - SLP(+)

O crescimento das linhagens foi similar durante os cultivos em LB, sendo que tanto o controle negativo quanto a linhagem que contém o Sistema de Lise Programada Completo cresceram mais no meio suplementado com glicose 3% (m/v) (Figura 20A e 20B). Os valores de fluorescência dos meios de cultivo de SLP(+). TP2 e SLPI(+). TP2 foram semelhantes entre si tanto nas condições de cultivo em meio LB suplementado com 3% (m/v) quanto com 0,5% (m/v) de glicose (Figura 20C e 20D). Observou-se que o valor máximo de fluorescência do controle negativo foi ligeiramente superior ao observado no cultivo da linhagem contendo o sistema completo. Além disso, os valores de fluorescência/DO600 das células de ambas as linhagens cultivadas nos dois meios foram iguais (Figura 20E e 20F). Dessa forma, foi concluído que, além de as linhagens produzirem quantidades similares de *sfGFP*, o Sistema de Lise Programada não funcionou como o esperado, pois não houve declínio da fluorescência intracelular de SLP(+).TP2 e o sobrenadante do cultivo desta linhagem não apresentou fluorescência maior que o controle negativo, indicando que a *sfGFP* foi liberada em decorrência da morte celular normal.

Figura 20 - Cultivo das linhagens SLPI(+).TP2 e SLP(+).TP2 em LB.

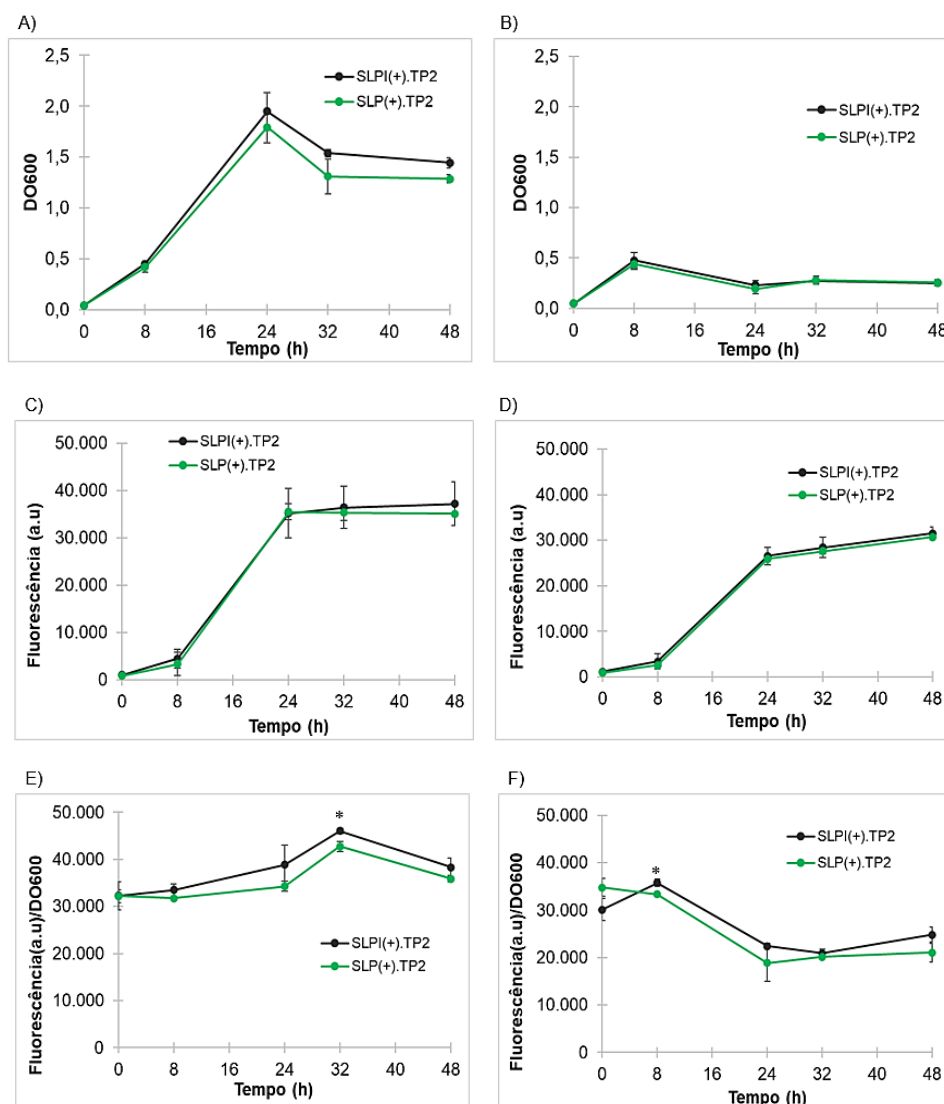


Fonte: Autora (2024).

A), C) e E) representam cultivos em LB + glicose 3% (m/v). **B), D) e F)** representam cultivos em LB + 0,5% (m/v). **A) e B)** Crescimento medido pela DO600. **C) e D)** Fluorescência do meio do cultivo gerada pela produção e liberação de sfGFP. **E) e F)** Fluorescência/DO600 das células de *B. subtilis* resultantes da sfGFP intracelular. SLP(+).TP2 (verde) e SLPI(+).TP2 (preto) referem-se às linhagens com o sistema completo e incompleto, respectivamente, sob controle de promotores fortes (+). Os valores máximos de cada gráfico foram analisados estatisticamente e os pontos que apresentaram diferenças significativas estão marcados com (*).

O padrão de resultados observado em LB foi reproduzido em meio MP nas duas concentrações de glicose (Figura 21).

Figura 21 - Cultivo das linhagens SLPI(+).TP2 e SLP(+).TP2 em MP.



Fonte: Autora (2024).

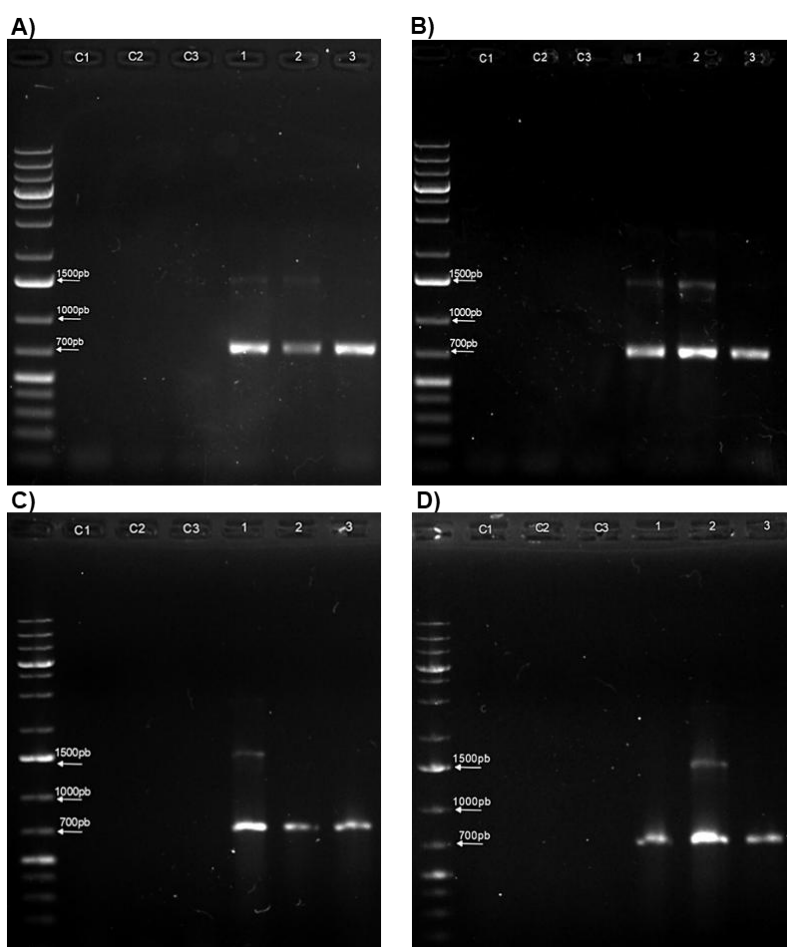
A), C) e E) representam cultivos em MP + glicose 3% (m/v). **B), D) e F)** representam cultivos em MP + 0,5% (m/v). **A) e B)** Crescimento medido pela DO600. **C) e D)** Fluorescência do meio do cultivo gerada pela produção e liberação de *sfGFP*. **E) e F)** Fluorescência/DO600 das células de *B. subtilis* resultantes da *sfGFP* intracelular. SLP(+).TP2 (verde) e SLPI(+).TP2 (preto) referem-se às linhagens com o sistema completo e incompleto, respectivamente, sob controle de promotores fortes (+). Foram realizadas análises estatísticas dos valores máximos de cada gráfico e os pontos estatisticamente diferentes estão marcados por (*).

Nestas condições de cultivo, a fluorescência intracelular foi ligeiramente maior no controle negativo após 48h de cultivo em MP com glicose 3% (m/v) e após 8h de cultivo em MP com glicose 0,5% (m/v), porém estes valores foram bastante similares indicando que as linhagens produziram quantidades similares

de *sfGFP*.

A Figura 22 apresenta os resultados das PCRs dos gDNAs extraídos da SLP(+).TP2 e do controle negativo após o cultivo.

Figura 22 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+).TP2 e SLP(+).TP2.



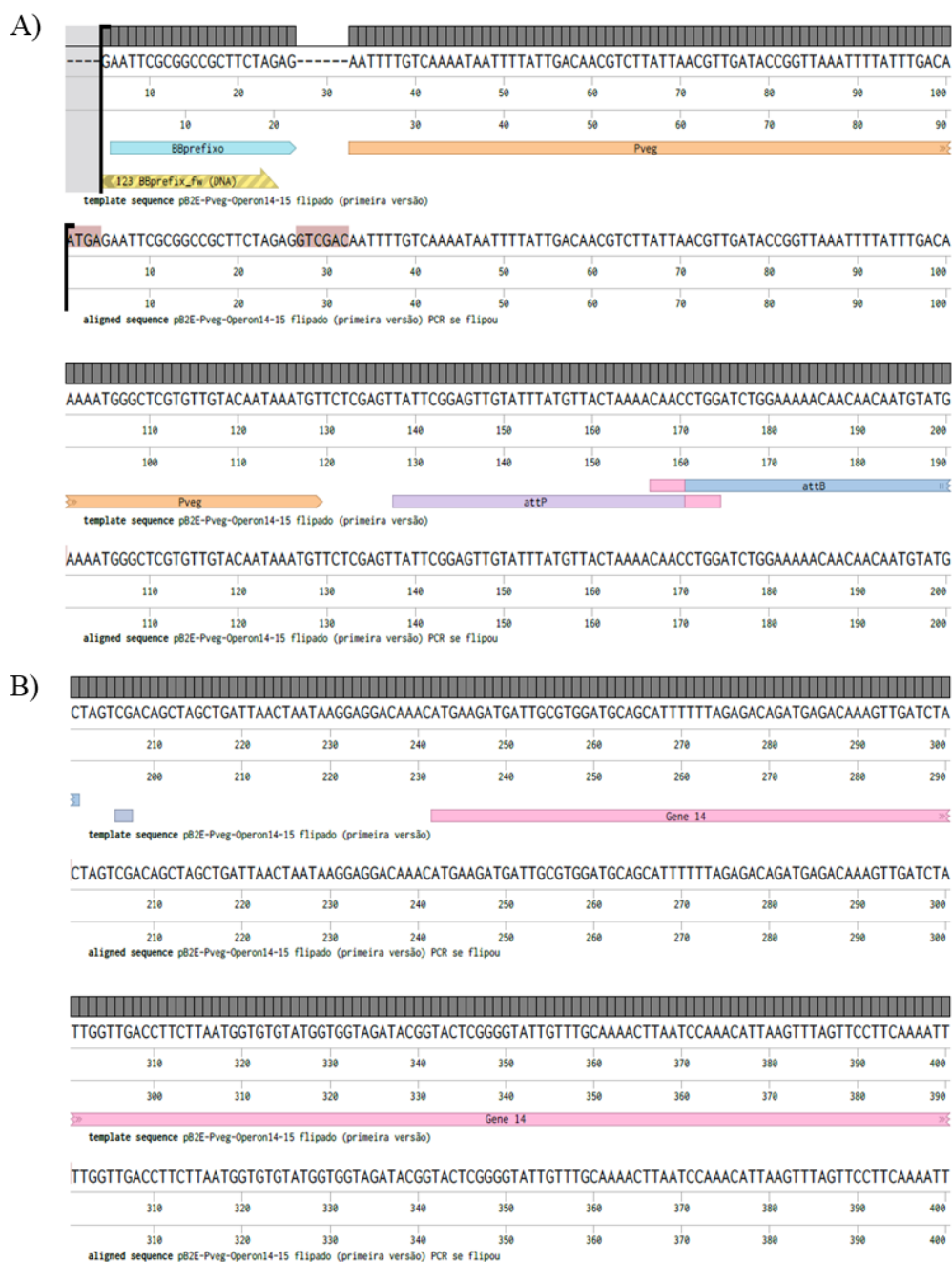
Fonte: Autora (2024).

A) e **B)** representam as PCRs do gDNA após o cultivo em LB, **C)** e **D)** representam as PCRs do gDNA após o cultivo em MP. **A)** cultivo em LB + glicose 3% (m/v). **B)** cultivo em LB+ glicose 0,5% (m/v). **C)** cultivo em MP + glicose 3% (m/v). **D)** cultivo em MP + glicose 0,5% (m/v). C1, C2 e C3 representam a linhagem com o sistema incompleto, SLPI(+).TP2, e 1, 2 e 3 representam a linhagem com o sistema de lise completo, SLP(+).TP2, ambos sob controle de promotores fortes (+).

Com relação as PCRs do gDNA da SLP(+).TP2, observou-se que, após 48h de cultivo, tanto em LB suplementado com glicose 3% (m/v) e LB com glicose 0,5% (m/v) (Figura 22A e 22B) como em MP suplementado com as

mesmas concentrações de glicose (Figura 22C e 22D) houve a presença de células que tiveram o sistema ativado e, com isso, o sentido do Operon14-15 invertido (949 pb), e células nas quais não houve a ativação do sistema (1.508 pb), visto que as PCRs resultaram em bandas de ambos os tamanhos. Entretanto, assim como foi observado para SLP(-), as bandas referentes ao Operon14-15 que teve o sentido invertido estão sempre presentes e claramente visíveis. Portanto, concluiu-se que o Sistema de Lise Programada foi ativado, que a Integrase é ativa em *B. subtilis*, porém o Operon14-15 não gerou a lise celular. Esse resultado foi confirmado por meio do sequenciamento do produto de PCR obtido a partir do DNA genômico extraído da linhagem contendo o Sistema de Lise Programada completo após o último cultivo. O alinhamento entre a sequência obtida no sequenciamento e a sequência esperada para o Operon14-15, após a inversão de sua orientação de codificação, demonstrou que a Integrase 13 estava funcionalmente ativa, promovendo a inversão do sentido do Operon14-15 (Figuras 23A e 23B).

Figura 23 - Sequenciamento entre a sequência esperada para o Operon14-15 que teve seu sentido flipado e a PCR do DNA genômico extraído da linhagem que contém o SLP completo.



Fonte: Alinhamento realizado no *Benchling* pela autora (2024).

A) Alinhamento que demonstra o promotor Pveg e os sítios *attP* e *attB* recombinados após o cultivo da linhagem. **B)** Alinhamento que demonstra o Gene14 codificado no mesmo sentido do Pveg, o que confirma a flipagem do Operon14-15.

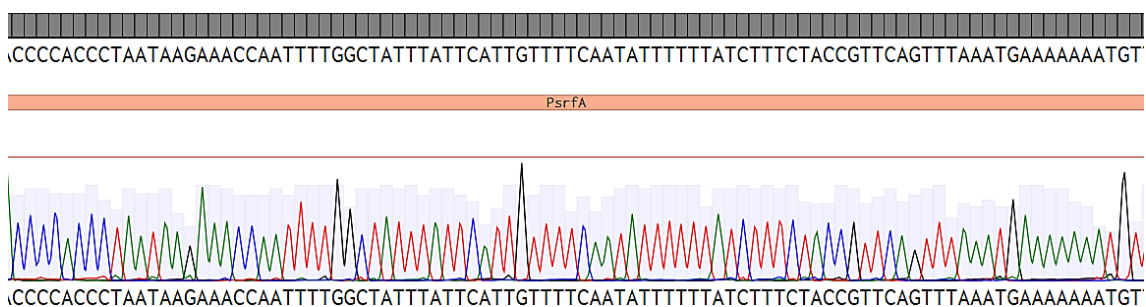
Além disso, considerando que as todas as linhagens cultivadas até este momento cresceram de forma similar tanto LB quanto em MP, além de terem crescimento maior nos meios com maior concentração de glicose, e que a Integrase foi ativada em todos os meios, os próximos cultivos foram realizados apenas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). Diferente do LB, o meio MP é definido e, portanto, não apresenta nenhuma outra fonte de carbono além da glicose adicionada, o que auxilia na interpretação dos resultados.

4.3. Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes induzido por Quórum Sensing – SLP(+).*P_{srfA}*

4.3.1. Construção do pBS1C-*P_{srfA}*-INT13-sfGFP

Os plasmídeos extraídos de *E. coli* TOP130 foram sequenciados e o plasmídeo positivo foi usado para transformar *B. subtilis*. O resultado do sequenciamento foi o mesmo tanto para a transformação de *E. coli* quanto para a transformação das linhagens de *B. subtilis*, portanto aqui estará apresentado o sequenciamento do produto da PCR do gDNA de *B. subtilis* (Figura 24).

Figura 24 - Alinhamento entre a sequência do e a resultante do processo de clonagem.



Fonte: Alinhamento realizado no *Benchling* pela autora (2024).
O promotor *P_{srfA}* está marcado em laranja.

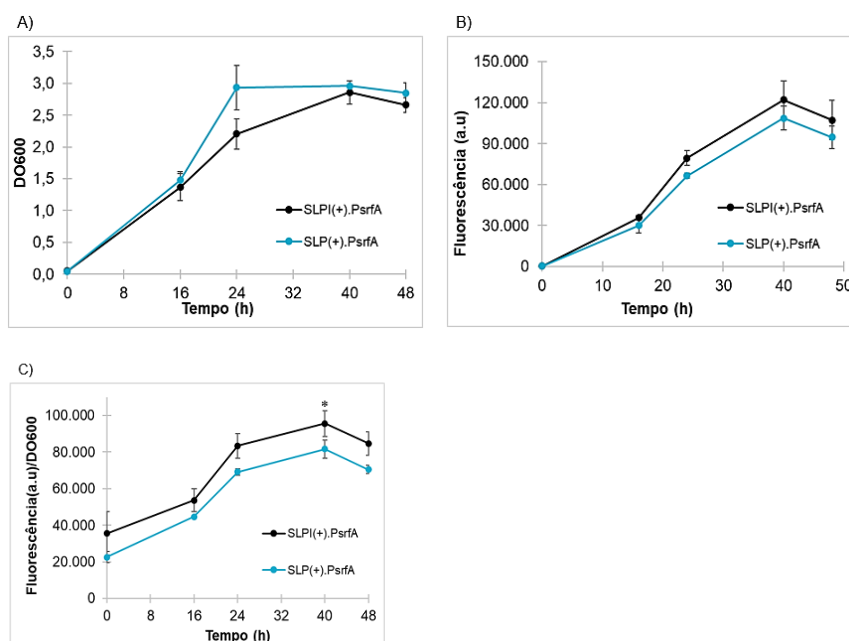
O alinhamento bem-sucedido entre a sequência esperada para o pBS1C-*P_{srfA}*-INT13-sfGFP e a sequência obtida após o processo de clonagem confirmou a inserção do promotor *P_{srfA}* no plasmídeo, assim como o sucesso na transformação das linhagens de *B. subtilis*. Com isso, foi possível confirmar a

construção da linhagem *B. subtilis* KO7::*P_{srfA}*-INT13-*sfGFP*.

4.3.2. Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes induzido por Quórum Sensing – SLP(+).*P_{srfA}*

Tanto SLPI(+).*P_{srfA}* quanto SLP(+).*P_{srfA}* apresentaram crescimento parecido, sendo que a linhagem com o sistema completo alcançou a fase estacionária pouco antes do controle negativo (Figura 25A). Neste teste, a fluorescência emitida tanto pelas células quanto pelo meio de cultivo do sistema completo foi ligeiramente inferior à do controle negativo. Isto indica que a linhagem utilizada como controle negativo produziu uma quantidade de *sfGFP* um pouco maior que a linhagem que contém o sistema completo, porém os valores obtidos não apresentaram diferenças expressivas. Este resultado aponta a ausência de lise induzida (Figura 25B e 25C).

Figura 25 - Cultivo das linhagens SLPI(+). *P_{srfA}* e SLP(+).*P_{srfA}* em MP.

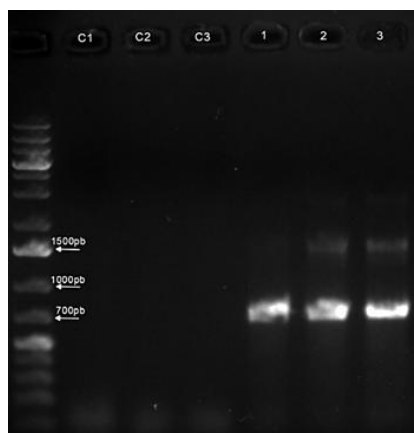


Fonte: Autora (2024).

A) Crescimento de SLPI(+).*P_{srfA}* e SLP(+).*P_{srfA}* cultivadas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). **B)** Fluorescência do meio de cultivo resultante do cultivo de SLPI(+).*P_{srfA}* e SLP(+).*P_{srfA}* em MP com glicose 3% (m/v). **C)** Fluorescência/DO600 das células do cultivo de SLPI(+).*P_{srfA}* e SLP(+).*P_{srfA}* em MP com glicose 3% (m/v). Nos gráficos, os pontos máximos foram analisados e estão marcados com (*) os que apresentam diferença estatística. Os valores referentes ao controle negativo estão apresentados em preto e os que se referem a linhagem com o sistema completo estão em azul.

A Figura 26 apresenta o resultado da PCR do gDNA das extraído das linhagens SLPI(+). *P_{srfA}* e SLP(+).*P_{srfA}* após 48h de cultivo.

Figura 26 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). *P_{srfA}* e SLP(+).*P_{srfA}*.



Fonte: Autora (2024).

PCRs do gDNA após o cultivo em MP + glicose 3% (m/v). C1, C2 e C3 representam a linhagem com o sistema incompleto, SLPI(+). *P_{srfA}*, e 1, 2 e 3 representam a linhagem com o sistema de lise completo, SLP(+). *P_{srfA}*.

O cultivo de SLP(+).*P_{srfA}* em MP + glicose 3% (m/v) resultou na ativação do Sistema de Lise Programada na maioria das células. Portanto, assim como foi observado nas variações anteriores do sistema, a Integrase 13 foi produzida em quantidade suficiente para gerar a ativação do sistema na maioria das células, porém não foi observada a lise celular.

4.4. Otimização dos RBSs dos genes 14 e 15 no Sistema de Lise Programada

Visto que a Integrase 13 está sendo produzida e atuando como o esperado em todas as variações do Sistema de Lise Programada, foi realizada a predição *in silico* das forças dos RBSs dos genes 14 e 15, a fim de verificar se uma taxa de tradução baixa destes genes seria responsável pela ausência de fenótipo de lise. De acordo com o *RBS Calculator*, a taxa de tradução do gene 14 é de 5.128 a.u e do gene 15 é de 830 a.u. Estes valores indicam que as proteínas codificadas por estes genes, possivelmente não estão sendo

produzidas na concentração mínima necessária para a lise da célula. Para comparação, a mesma predição feita para a Integrase 13 resultou em taxa de tradução de 15.620 a.u.

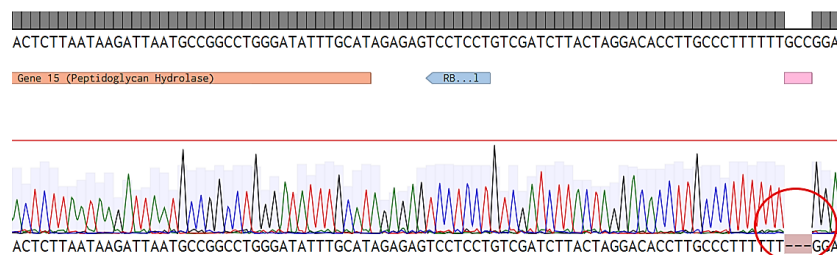
Com intuito de aumentar a taxa de tradução, foram simuladas algumas alterações nas sequências adjacentes aos RBSs. A deleção de 2 nucleotídeos na região 5'-UTR do gene 14 e de 3 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15 resultou em aumento significativos das taxas de tradução para 12.961 a.u. para o gene 14 e 19.466 a.u para o gene 15. Dessa forma, foi elaborada a hipótese de que a deleção destes nucleotídeos por mutação sítio-dirigida resulte em níveis mais elevados de expressão para a Holina (codificada pelo gene 14) e a Peptidoglicano Hidrolase (codificada pelo gene 15) e, com isso, gerem a lise das células.

Abaixo, estão apresentados os resultados referentes à linhagem contendo o Sistema de Lise Programada completo na qual o Operon14+15 apresenta a deleção dos 3 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15, obtida por mutação sítio-dirigida. Adicionalmente, estão os resultados obtidos para a linhagem que também contém o Sistema de Lise Programada completo, porém cujo Operon14+15 possui as duas deleções simultâneas - 2 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 14 e os mesmos 3 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15. Esta segunda construção foi sintetizada na forma de *gBlock* e clonada em plasmídeo por meio de técnicas clássicas de Biologia Molecular.

4.4.1. Construção do plasmídeo contendo apenas a deleção dos nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15 (pBS2E-P_{veg}-Operon14-15_mutação15)

Foram sequenciados 8 plasmídeos extraídos de *E. coli* transformadas com o produto da mutação sítio-dirigida (Figura 27).

Figura 27 - Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS2E-P_{veg}-Operon14-15 e a resultante do processo de mutação sítio-dirigida.

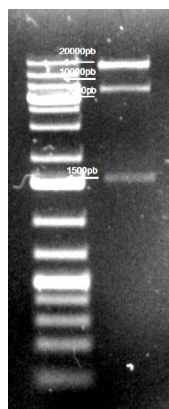


Fonte: Alinhamento realizado pela autora no *Benchling* (2025).

Em laranja está representado o início do gene 15 e, em azul, está o RBS. Os nucleotídeos a serem deletados estão marcados em rosa. Circulado em vermelho, está representado o *mismatch* que demonstra que estes nucleotídeos foram removidos com sucesso.

O alinhamento bem-sucedido entre a sequência do pBS2E-P_{veg}-Operon14-15 e a obtida do processo de mutação sítio-dirigida (plasmídeo número 2) confirmou a deleção dos 3 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15. A Figura 28 apresenta o resultado da verificação do tamanho deste plasmídeo.

Figura 28 - Digestão do plasmídeo pBS2E-P_{veg}-Operon14-15_mutação15 com as enzimas *Xba*I e *Spe*I.



Fonte: Autora (2025).

Na figura, observa-se que a digestão do plasmídeo gerou os fragmentos do tamanho esperado. O fragmento que se encontra entre 10 e 20kb é referente ao plasmídeo não digerido.

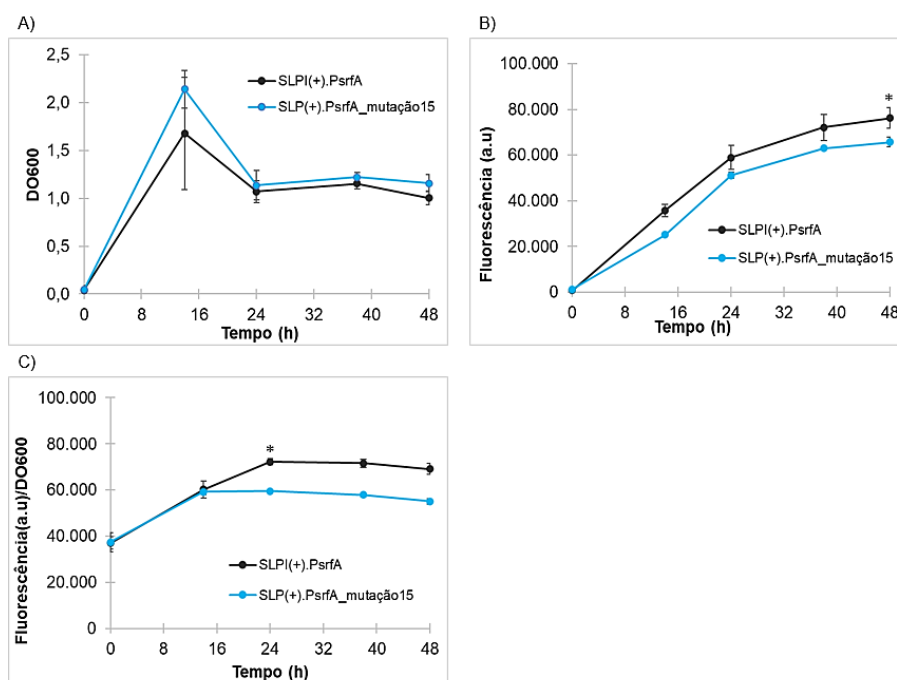
Os fragmentos obtidos na digestão pelas enzimas *Xba*I e *Spe*I do plasmídeo sequenciado apresentaram os tamanhos esperados de 6.250 pb e 1599 pb (Figura 28). Isto confirmou que o plasmídeo resultante do processo de mutação sítio-dirigida apresentou o tamanho correto. Além disso, os alinhamentos entre as sequências fornecidas pelo sequenciamento dos produtos das PCRs dos gDNAs das linhagens de *B. subtilis* transformadas pelo plasmídeo pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação15 e a sequência esperada para o mesmo foi igual ao apresentado na Figura 27, confirmando assim o desenvolvimento das linhagens SLP(+).TP2_mutação15 e SLP(+). P_{srfA} _mutação 15.

A linhagem SLP(+).TP2_mutação 15 apresenta o gene que codifica a Integrase 13 cuja expressão é controlada pelo promotor TP2 e pelo Sistema de Repressão Catabólica por Carbono. Adicionalmente, contém o Operon 14-15 com a deleção de três nucleotídeos localizados na região adjacente ao RBS do gene 15, além de estar sob controle do promotor P_{veg} e codificado no sentido inverso ao mesmo. A linhagem SLP(+). P_{srfA} _mutação15 possui as mesmas características da SLP(+).TP2_mutação 15, diferenciando-se pelo fato de que o gene da Integrase 13 se encontra sob regulação do promotor P_{srfA} e do Sistema de Quórum Sensing.

4.4.2. Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes com a mutação15

O crescimento da linhagem SLP(+). P_{srfA} _mutação15 foi similar ao seu controle negativo sendo que ambas atingiram a fase estacionária ao mesmo tempo (Figura 29A).

Figura 29 - Cultivo das linhagens SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). $P_{srfA_mutação15}$ em MP.



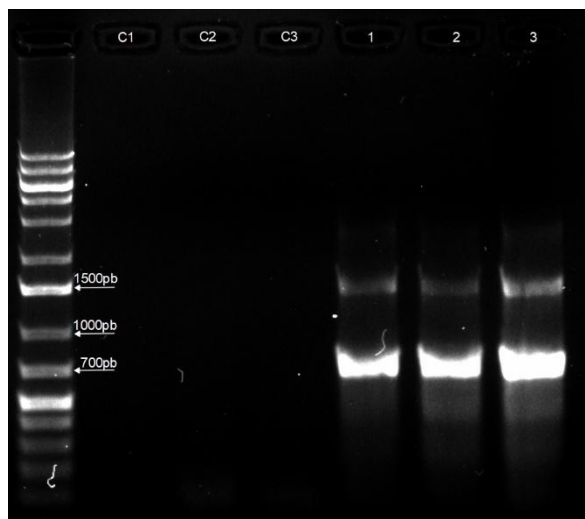
Fonte: Autora (2025).

A) Crescimento de SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). $P_{srfA_mutação15}$ cultivadas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). **B)** Fluorescência do meio de cultivo resultante do cultivo de SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). $P_{srfA_mutação15}$ em MP com glicose 3% (m/v). **C)** Fluorescência/DO600 das células do cultivo de SLPI(+). P_{srfA} e SLP(+). $P_{srfA_mutação15}$ em MP com glicose 3% (m/v). Foram analisados os pontos máximos de cada gráfico e os que apresentaram diferença significativa estão marcados com (*). O controle negativo está representado em preto e a linhagem que contém o sistema completo está representada em azul.

A fluorescência/DO600 (Figura 29C) mostra uma queda para a linhagem com o Sistema de Lise Programada completo após 12h, o que poderia indicar que houve a liberação da *sfGFP* por ativação do sistema. Entretanto, a fluorescência medida no meio de cultura não reproduz esse fenômeno, mantendo um padrão de aumento similar ao controle negativo (Figura 29B). Dessa forma, foi concluído que possivelmente não houve a lise celular induzida pelo Sistema de Lise Programada.

A Figura 30 apresenta o resultado da PCR do gDNA extraído das células resultantes do cultivo.

Figura 30 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). *P_{srfA}* e SLP(+).*P_{srfA}*_mutação15.



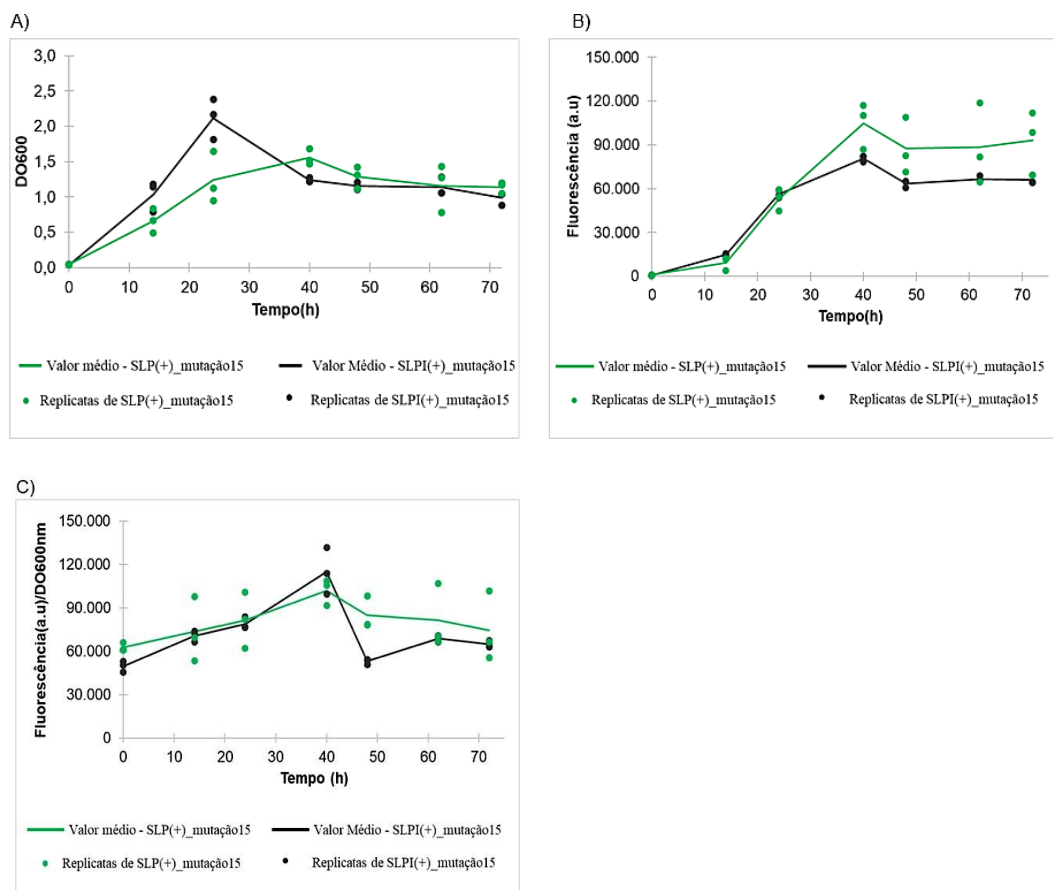
Fonte: Autora (2025).

PCRs do gDNA após o cultivo em MP + glicose 3% (m/v). C1, C2 e C3 representam a SLPI(+). *P_{srfA}* a qual consiste na *B. subtilis* KO7 com o sistema incompleto, e 1, 2 e 3 representam a linhagem com o sistema de lise completo contendo a deleção dos 3 nucleotídeos na região próxima ao RBS, SLP(+).*P_{srfA}*_mutação15.

Nesta etapa do trabalho foram realizadas PCRs após 14, 24, 48 e 72 horas de cultivo e todas resultaram nos mesmos fragmentos amplificados. Isto demonstra a presença de uma população celular heterogênea, em que uma parte das células teve o sentido do Operon14-15 flipado e outra parte manteve o Operon14-15 no sentido original, uma vez que as PCRs resultaram nos fragmentos de 1.463 pb (não flipado) e 869 pb (flipado). Portanto, o aumento na taxa de tradução do gene 15 não foi suficiente para promover a lise celular na linhagem que contém o gene codificador da Integrase 13, cuja expressão é regulada pelo sistema de Quórum Sensing. Isso indica que a ativação do Sistema de Lise Programada não foi eficaz em induzir o rompimento celular nessas condições.

Com relação ao cultivo da linhagem SLP(+).TP2_mutação15, esta apresentou um crescimento um pouco mais lento e atingiu uma DO600 no pico um pouco menor que o controle (Figura 31A).

Figura 31 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 em MP.



Fonte: Autora (2025).

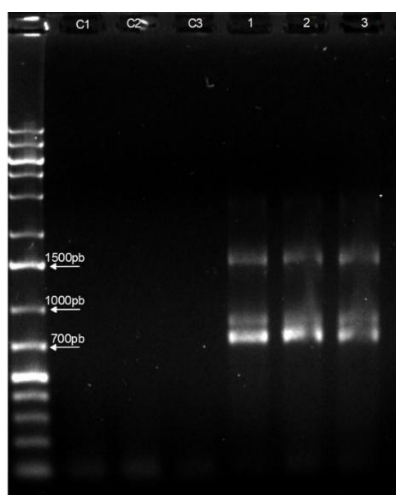
A) Crescimento de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 cultivadas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). **B)** Fluorescência do meio de cultivo resultante do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 em MP com glicose 3% (m/v). **C)** Fluorescência/DO600nm das células do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 em MP com glicose 3% (m/v). Nos gráficos, os pontos representam os valores de cada uma das triplicatas, e as linhas representam os valores das médias. A cor verde corresponde à linhagem que tem o Sistema de Lise Programada completo e a cor preto representa o controle negativo.

Os valores de fluorescência intracelular foram similares entre a linhagem que contém o Sistema de Lise Programada completo e seu controle negativo o que indica que a quantidade de sfGFP produzida pelas mesmas foi parecida (Figura 31C). Entretanto, observou-se que uma das replicatas do cultivo da SLP(+).TP2_mutação15 apresentou valores de fluorescência do meio de cultivo superiores à média e ao controle negativo (Figura 31B). Os gráficos referentes aos cultivos com esta linhagem foram apresentados com pontos representando

as replicatas e linhas representando as médias para evidenciar a diferença nos valores de fluorescência extracelular entre as replicatas enquanto a fluorescência intracelular e o crescimento foram similares. Considerando que todos os cultivos foram realizados em triplicata biológica, formulou-se a hipótese de que o Sistema de Lise Programada estaria promovendo lise celular especificamente na colônia correspondente à 1. Para testar essa hipótese, foi realizado um novo cultivo das linhagens, utilizando exclusivamente a colônia 1 da linhagem SLP(+).TP2_mutação15, sendo realizada uma triplicata técnica a partir dessa amostra.

Além disso, as PCRs do gDNA extraído das células resultantes do cultivo após 14, 24, 48 e 72 horas de cultivo (Figura 32) seguiu o mesmo padrão que o observado anteriormente, comprovando o funcionamento da integrase, mas com uma mistura na população de células com o operon flipado e não flipado.

Figura 32 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15.



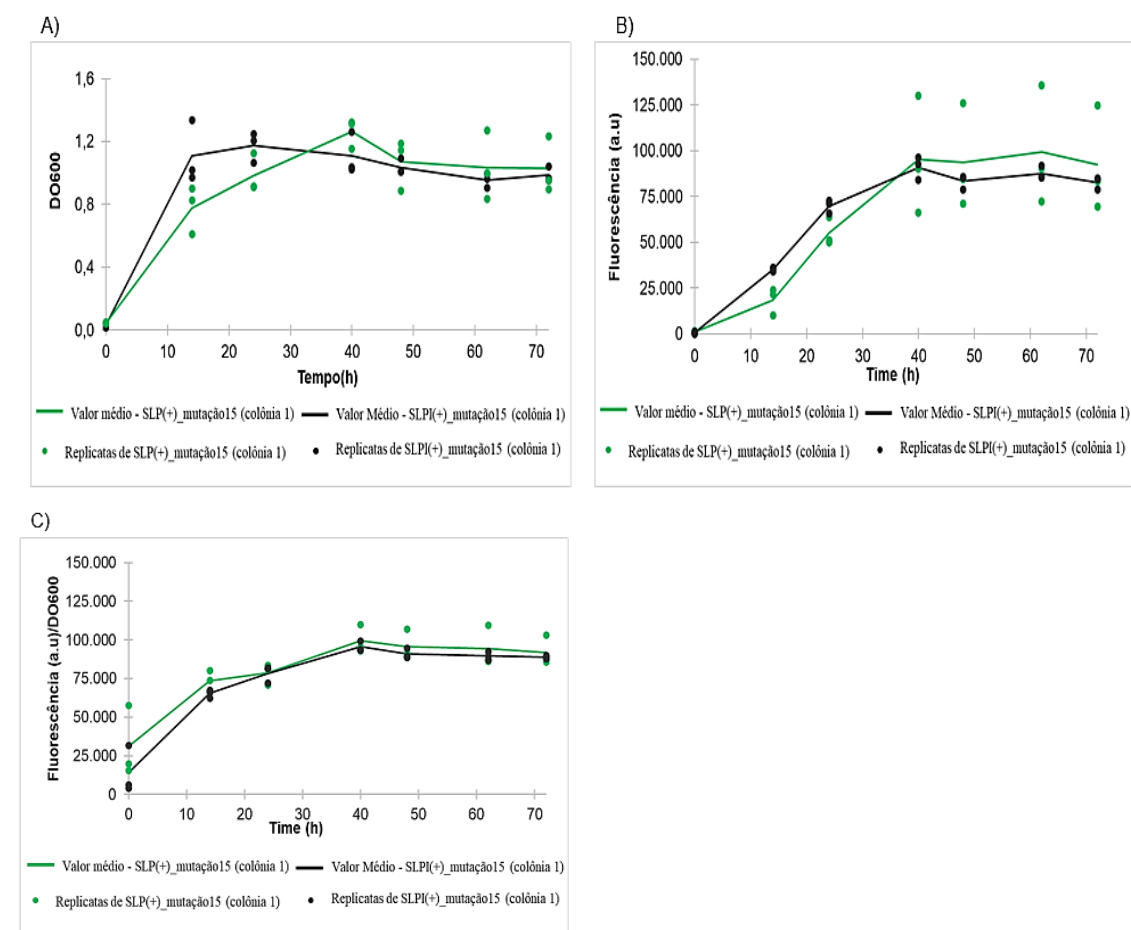
Fonte: Autora (2025).

PCRs do gDNA após o cultivo em MP + glicose 3% (m/v). C1, C2 e C3 representam a *B. subtilis* KO7 com o sistema incompleto, SLPI(+). TP2, e 1, 2 e 3 representam a linhagem com o sistema de lise completo que possui a deleção dos 3 nucleotídeos na região próxima ao RBS do gene 15, SLP(+).TP2_mutação15. As PCRs dos pontos de 14, 24, 48 e 72 horas de cultivo seguiram este mesmo padrão.

Com isso, foi realizado o novo cultivo de SLP(+).TP2_mutação15, desta vez apenas com a colônia 1, além do controle negativo. Neste cultivo, o

crescimento do controle negativo e da linhagem que contém o Sistema de Lise Programada completo reproduziu o padrão anterior (Figura 33A).

Figura 33 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP.



Fonte: Autora (2025).

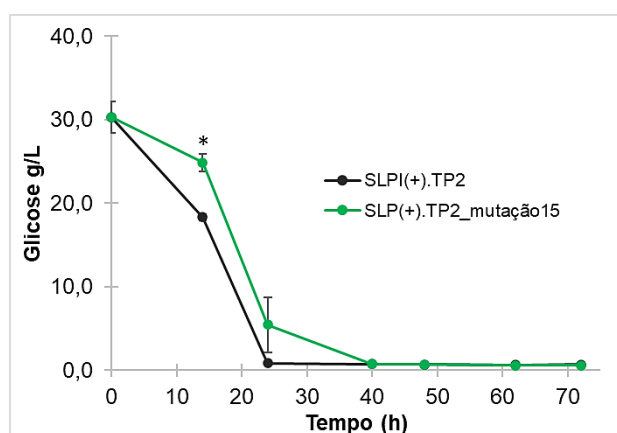
A) Crescimento de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) cultivadas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). **B)** Fluorescência do meio de cultivo resultante do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP com glicose 3% (m/v). **C)** Fluorescência/DO600 das células do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP com glicose 3% (m/v). Nos gráficos, os pontos representam os valores das triplicatas e as linhas estão representando os valores das médias. A cor verde corresponde à linhagem que tem o Sistema de Lise Programada completo e a cor preto representa o controle negativo.

A fluorescência intracelular da SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) e do controle negativo foram similares, indicando que ambas produziram quantidades parecidas de *sfGFP* (Figura 33C). Entretanto, novamente uma das replicatas de SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) apresentou fluorescência extracelular maior

que as demais e maior que o controle negativo, indicando potencial funcionamento do sistema (Figura 33B).

Foi realizada a quantificação de glicose no meio ao longo do cultivo. Na Figura 34 estão apresentadas as médias destes resultados, uma vez que houve pouca variação entre as replicatas.

Figura 34 - Concentração de glicose (g/L) ao longo do cultivo de SLPI(+).TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP.



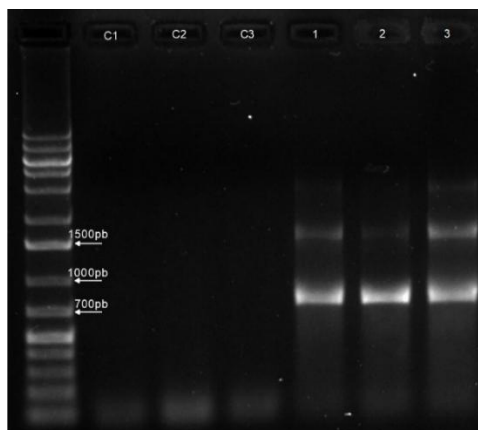
Fonte: Autora (2025).

A concentração de glicose no ponto de 0h é a concentração referente ao meio de cultura (MP suplementado com glicose 3% (m/v)). Os valores foram analisados estatisticamente e os pontos marcados com (*) apresentam diferença estatística.

O consumo de glicose foi ligeiramente mais rápido para o controle negativo. Após 24 h de cultivo, verificou-se que ambas haviam consumido mais de 80% da glicose disponível no meio. Essa similaridade no perfil de consumo de glicose corrobora os resultados obtidos para o crescimento celular, uma vez que estas linhagens apresentaram crescimento parecido. Vale notar que o aumento de fluorescência extracelular para a replicata do sistema completo que destoa das outras ocorre após as 24h de cultivo, ou seja, após a exaustão da glicose.

A Figura 35 apresenta os fragmentos gerados pelas PCRs dos gDNAs extraídos das células resultantes do cultivo, após 14, 24, 48 e 72 horas de cultivo. Estas PCRs continuaram apresentando o mesmo padrão que observado anteriormente.

Figura 35 - PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1).



Fonte: Autora (2025).

PCRs do gDNA após o cultivo em MP + glicose 3% (m/v). C1, C2 e C3 representam a *B. subtilis* KO7 com o sistema incompleto, SLPI(+). TP2, cultivada como o controle negativo, e 1, 2 e 3 representam a triplicata da colônia 1 da linhagem com o sistema de lise completo que contém a deleção dos 3 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15, SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1). As PCRs dos pontos de 14, 24, 48 e 72 horas de cultivo resultaram nos mesmos fragmentos.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a deleção dos três nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15 conferiu ao Sistema de Lise Programada a capacidade de induzir a lise celular após sua ativação. Entretanto, essa ativação não resulta na lise completa da população celular, fazendo com que parte das células permaneça íntegra. Isto é evidenciado pelos valores de fluorescência extracelular, em que apenas uma replicata apresentou o fenótipo de lise celular, além de que as PCRs dos gDNAs das células resultantes dos cultivos apresentaram fragmentos referentes ao Operon14+15 flipado e não flipado.

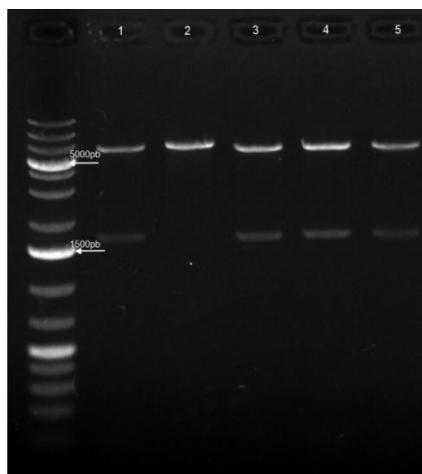
Entre todas as linhagens desenvolvidas até este momento, a SLP(+).TP2_mutação15 foi a linhagem que apresentou o fenótipo esperado para a lise celular decorrente da ativação do Sistema de Lise Programada. Isto demonstrou que o controle da expressão do gene que codifica a Integrase 13 pelo promotor sintético TP2 e pelo Sistema de Repressão Catabólica por Carbono consistiu no melhor sistema regulatório para a composição do Sistema de Lise Programada. Com isso, a continuação do trabalho foi realizada nesta

linhagem.

4.4.3. Construção do plasmídeo contendo as deleções dos nucleotídeos próximos aos RBSs dos genes 14 e 15 (pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação14+15)

A Figura 36 apresenta os fragmentos obtidos a partir da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* dos plasmídeos extraídos de *E. coli* TOP10 após o processo de clonagem do *gBlock* que corresponde ao Operon14-15 com a mutação 14+15 (deleção de 2 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 14 e de 3 nucleotídeos próximos ao RBS do gene 15). O Operon14-15 encontra-se sob controle do promotor P_{veg} , flanqueado pelos sítios de reconhecimento da Integrase 13 e codificado no sentido inverso ao promotor.

Figura 36 - Digestão para testar a clonagem no Operon14-15 que contém a mutação 14+15.



Fonte: Autora (2025).

Os números 1 ao 6 representam os plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* TOP10 que cresceram após a transformação do plasmídeo resultante da mutação sítio-dirigida para a mutação14+15. Os tamanhos esperados eram 6.217 pb e 1.630 pb.

Os plasmídeos 1 e 3-5 extraídos de *E. coli* TOP10 apresentaram os fragmentos dos tamanhos esperados (6.217 pb e 1.630 pb) após a digestão pelas enzimas. Os plasmídeos 1 e 3 foram confirmados por sequenciamento, e

o plasmídeo 1 foi usado para transformar a linhagem de *B. subtilis* que já continha o gene que codifica a Integrase13 sob controle do TP2 (Figura 37).

Figura 37 - Alinhamento entre a sequência fornecida pelo sequenciamento e o pBS2E-P_{veg}-Operon14-15 para verificar a mutação14+15.

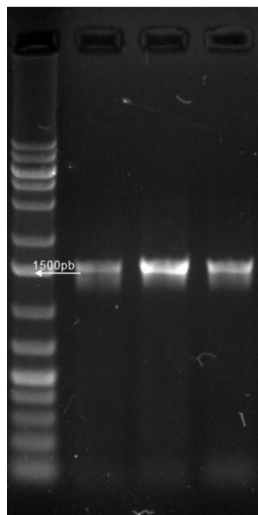


Fonte: Alinhamento realizado pela autora no *Benchling* (2025).

A) representa o *mismatch* que confirma a mutação 15 circulado em azul, o RBS marcado em azul e o início do gene 15 em laranja. **B)** O início do gene 14 está representado em rosa, o RBS em azul e o *mismatch* que confirma a deleção 14 está circulado em roxo.

O alinhamento entre a sequência fornecida pelo sequenciamento e a resultante do processo de clonagem confirmou o desenvolvimento do plasmídeo pBS2E-P_{veg}-Operon14-15_mutação14+15. A Figura 38 apresenta a PCR do gDNA que confirmou a inserção deste plasmídeo na *B. subtilis*.

Figura 38 - PCR do gDNA de *B. subtilis* transformadas pelo pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação14+15.



Fonte: Autora (2025).

Os fragmentos gerados pelas PCRs apresentaram o tamanho esperado o que confirma a transformação da bactéria.

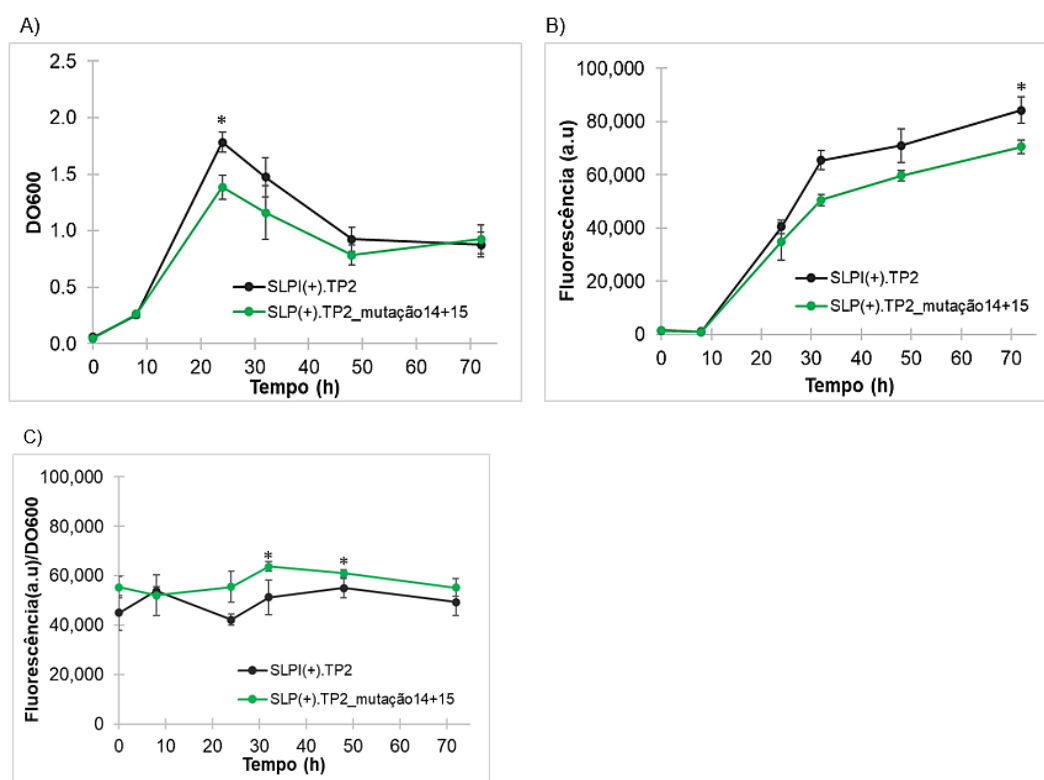
O fragmento resultante da PCR do gDNA de *B. subtilis* transformada com o pBS2E- P_{veg} -Operon14-15_mutação14+15 apresentou o tamanho esperado (1.508 pb), confirmando o desenvolvimento da linhagem SLP(+).TP2_mutação14+15. Portanto, a linhagem SLP(+).TP2_mutação14+15 apresenta o gene que codifica a Integrase 13, cuja expressão é regulada pelo promotor TP2 em conjunto com o Sistema de Repressão Catabólica por Carbono. Adicionalmente, essa linhagem contém o Operon 14+15, codificado no sentido oposto ao seu promotor P_{veg} , e que apresenta deleções de 2 e 3 nucleotídeos localizadas nas regiões adjacentes aos RBSs dos genes 14 e 15, respectivamente. As linhagens 1,2 e 3 (Figura 38) foram cultivadas a fim de validar esta nova versão do sistema.

4.4.4. Validação do Sistema de Lise Programada com Promotores Fortes com a mutação14+15

Neste experimento, os inóculos apresentaram crescimento mais lento, sendo necessário mantê-los em incubação por 16 horas. Além disso, tanto o

cultivo do controle negativo quanto da linhagem que contém o Sistema de Lise Programada completo foram realizados em triplicata técnica e duplicata biológica, pois o inóculo proveniente de uma colônia de cada linhagem não apresentou crescimento, o que inviabilizou a realização da triplicata biológica. A linhagem SLP(+).TP2_mutação14+15 e seu controle negativo, SLPI(+). TP2, apresentaram crescimento semelhante e atingiram a fase estacionária no mesmo momento (Figura 39A).

Figura 39 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação14+15 em MP.



Fonte: Autora (2025).

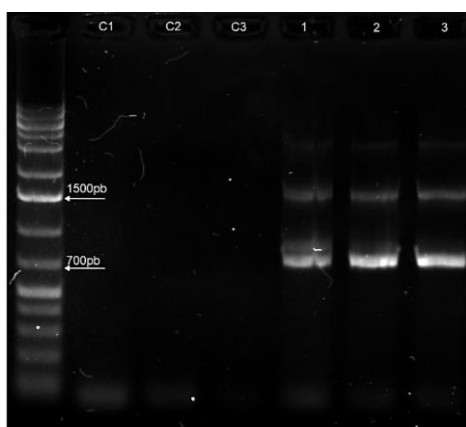
A) Crescimento de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação14+15 cultivadas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). **B)** Fluorescência do meio de cultivo resultante do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação14+15 em MP com glicose 3% (m/v). **C)** Fluorescência/DO600 das células do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação14+15 em MP com glicose 3% (m/v). Os valores máximos de cada gráfico apresentaram-se estatisticamente iguais.

Tanto os valores de fluorescência intracelular quanto extracelular foram semelhantes entre a linhagem que contém o Sistema de Lise Programada

Completo e o controle negativo (Figura 39B e 39C) sendo que a fluorescência do sobrenadante do controle negativo foi levemente superior à da linhagem que contém o sistema completo. Estes resultados indicam que o Sistema de Lise Programada não causou a lise celular e as bactérias morreram devido à escassez de nutrientes.

A Figura 40 apresenta o resultado das PCRs do gDNA extraído das células cultivadas no ponto de 24 h, para verificação da atividade integrase.

Figura 40 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação14+15.



Fonte: Autora (2025).

PCRs do gDNA após o cultivo em MP + glicose 3% (m/v). C1, C2 e C3 representam as PCRs do gDNA da linhagem cultivada como controle negativo, *B. subtilis* KO7 com o sistema incompleto, SLPI(+). TP2. 1, 2 e 3 representam a linhagem com o sistema de lise completo que contém a deleção dos 2 e 3 nucleotídeos próximos aos RBSs do gene14 e gene 15, respectivamente, SLP(+).TP2_mutação14+15. As PCRs dos pontos de 14, 24, 48 e 72 horas de cultivo resultaram nos mesmos fragmentos.

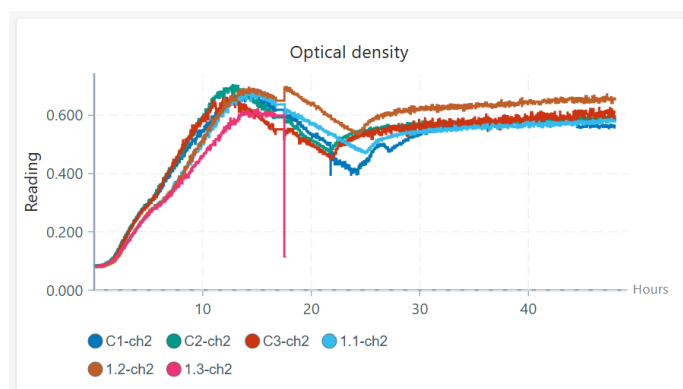
Os fragmentos gerados pelas PCRs indicaram que uma parte das células tiveram o sentido do Operon14+15 invertido e outra parte manteve o operon no sentido original. Apesar da presença de células em que o Sistema de Lise Programada foi ativado, não foi observado o fenótipo esperado para a lise celular, uma vez que não houve diferença significativa nos valores de fluorescência extracelular entre a SLP(+).TP2_mutação14+15 e o seu controle negativo. Portanto, as células foram capazes de sobreviver ao Sistema de Lise

Programada. Isto evidenciou que a melhor linhagem para compor o Sistema de Lise Programada foi a SLP(+).TP2_mutação15 uma vez que esta foi a única linhagem a apresentar valores de fluorescência extracelular maiores que o controle negativo após produzirem quantidades semelhantes de *sfGFP* uma vez que os valores de fluorescência intracelular foram parecidos entre as linhagens. Isto demonstra que a fluorescência extracelular foi decorrente da lise programada. Com isso, a SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) foi a linhagem escolhida para ser cultivada no Pioreactor. Este cultivo foi realizado a fim de testar a hipótese de que a otimização das condições de cultivo poderia aumentar a taxa de produção das enzimas que geram a lise celular, otimizando assim o Sistema de Lise Programada.

4.5. Cultivo no Pioreactor

Durante o cultivo da linhagem SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) e seu controle negativo SLP(+).TP2 no Pioreactor, foi gerado um gráfico de valores DO600 ao longo do tempo (Figura 41).

Figura 41 - Densidade ótica de SLP(+).TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) durante o cultivo no Pioreactor.

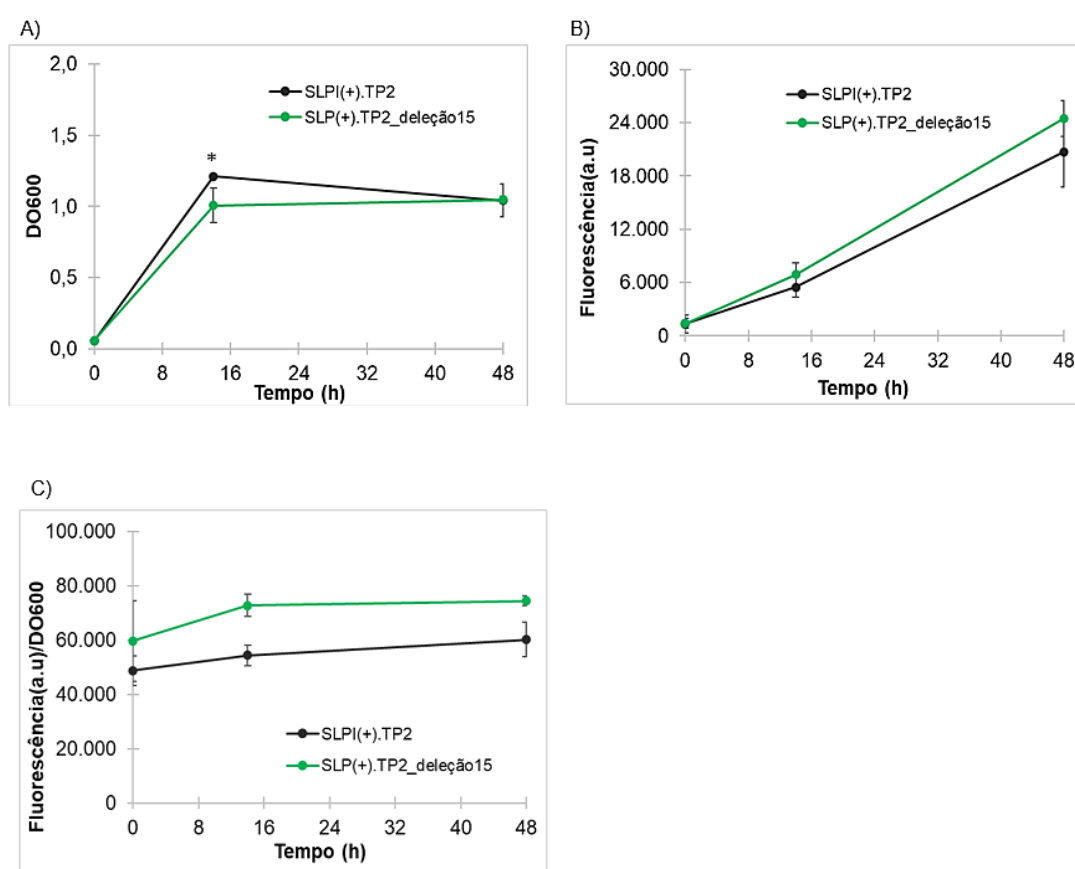


Fonte: Gráfico gerado pelo *software* do Pioreactor (2025).

Os resultados do controle negativo SLP(+).TP2 estão apresentados por C1, C2 e C3. Já os resultados referentes a SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) são 1.1, 1.2 e 1.3. A queda na DO600 de 1.3 (rosa), após 16 horas de cultivo, foi decorrente da desconexão do cultivo desta replicata, portanto a partir deste ponto o cultivo de SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) passou a ser realizado em duplicata. O *software* do Pioreactor apresenta os resultados das replicatas e não das médias.

Os valores de DO600 das linhagens foram próximos uns dos outros ao longo do cultivo, indicando que as linhagens cresceram de forma similar. Foram coletadas amostras do cultivo nos tempos 0, 14h e ao final do cultivo após 48h. Essas amostras foram quantificadas na leitora de microplacas quanto a DO600 e fluorescência (Figura 42).

Figura 42 - Cultivo das linhagens SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP no Pioreactor.



Fonte: Autora (2025).

A) Crescimento de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) cultivadas em MP suplementado com glicose 3% (m/v). **B)** Fluorescência do meio de cultivo resultante do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP com glicose 3% (m/v). **C)** Fluorescência/DO600 das células do cultivo de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) em MP com glicose 3% (m/v). Os valores máximos de cada gráfico foram analisados estatisticamente e os que apresentaram diferença significativa estão marcados com (*).

Apesar de o controle negativo ter crescido um pouco mais que a SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) no ponto de 16 h de cultivo, os valores de

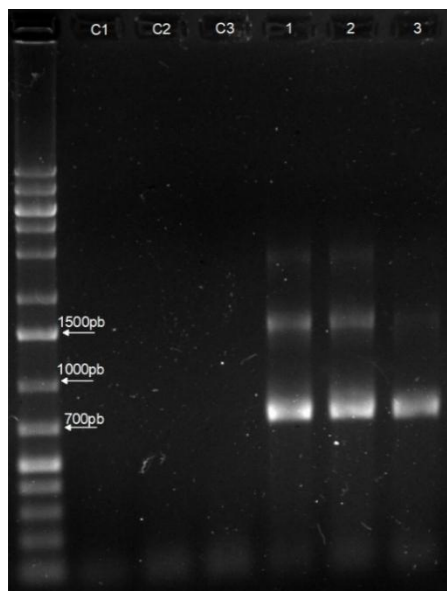
DO600 foram próximos um do outro (Figura 42A). Além disso, não houve diferença significativa entre os valores de fluorescência extracelular e intracelular entre a linhagem que contém o Sistema de Lise Programada completo e o controle negativo (Figura 42B e 42C), indicando que não houve lise celular gerada pela ativação do Sistema de Lise Programada.

Neste cultivo, tanto os valores de fluorescência intracelular quanto extracelular foram inferiores ao cultivo das mesmas linhagens em tubo de ensaio. Enquanto os valores de fluorescência média das células (fluorescência/DO600) do controle negativo foram 60.241 ± 6.427 a.u. e da linhagem que contém o Sistema de Lise completo foi 74.507 ± 1.962 a.u., após 48 h de cultivo em Pioreactor, a fluorescência das células destas linhagens cultivadas em tubo de ensaio foi 90.808 ± 3.270 a.u. e 95.527 ± 9.830 a.u., respectivamente. Com relação à fluorescência extracelular, os valores referentes ao controle negativo e à SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) foram 20.703 ± 3.986 a.u. e 24.470 ± 2.005 a.u. em Pioreactor, e $83.443 \pm 3.930,58$ a.u. e $93.777 \pm 28.618,39$ a.u. em tubo de ensaio, respectivamente.

O crescimento da linhagem cultivada como controle negativo foi parecido nas duas condições de cultivo, uma vez que a DO600 máxima em Pioreactor foi $1,21 \pm 0,01$ e em tubo de ensaio foi $1,17 \pm 0,1$. Já a linhagem SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) apresentou um crescimento superior em tubo de ensaio ao alcançar a DO600 máxima igual a $1,26 \pm 0,09$ enquanto a DO600 máxima em Pioreactor foi igual a $1,05 \pm 0,02$. Com isso, foi possível concluir que o cultivo em Pioreactor não forneceu as condições melhores para o crescimento da *B. subtilis*, assim como não favoreceu a produção da sfGFP. Dessa forma, SLP(+).TP2_mutação15 (colônia 1) não apresentou o fenótipo de lise celular quando cultivada em Pioreactor. Portanto, o cultivo em tubo de ensaio gerou condições mais favoráveis para a lise celular quando comparado com o cultivo em Pioreactor.

A Figura 43 mostra os fragmentos de DNA gerados pelas PCRs dos gDNAs extraídos das linhagens cultivadas em Pioreactor, para verificação da atividade integrase.

Figura 43 - Verificação da atividade da Integrase por PCR do gDNA de SLPI(+). TP2 e SLP(+).TP2_mutação15 – cultivo em Pioreactor.



Fonte: Autora (2025).

PCRs do gDNA após o cultivo em MP + glicose 3% (m/v) em Pioreactor. C1, C2 e C3 correspondem às PCRs do gDNA do controle negativo. 1, 2 e 3 representam a linhagem com o sistema de lise completo que contém a deleção dos 3 nucleotídeos próximos aos RBSs do gene 15, SLP(+).TP2_mutação15. As PCRs dos pontos de 16 e 48 horas de cultivo resultaram nos mesmos fragmentos.

Novamente, as PCRs dos gDNAs resultaram em fragmentos dos tamanhos correspondentes ao Operon14+15 flipado (949 pb) e não flipado (1.508 pb). A presença de células que tiveram o Operon14+15 flipado e a ausência da lise celular demonstram que esta condição de cultivo não favoreceu a lise celular programada, ao contrário do que foi observado no tubo de ensaio. Portanto, outras condições de cultivo que possam otimizar o crescimento, assim como a produção da proteína de interesse, poderão aumentar a produção das enzimas Holina e Petideoglicano Hidrolase, possivelmente aumentando assim a resposta a ativação do Sistema de Lise Programada.

5. Discussão

Neste trabalho, buscamos desenvolver um sistema que induz a morte celular, em oposição aos mecanismos naturais de sobrevivência. Nessa perspectiva, ao promover a eliminação de parte da população, é plausível que ocorra a seleção de uma minoria de células portadoras de mutações que lhes conferem capacidade de escapar ao sistema e, conseqüentemente, sobreviver. Esse fenômeno pode constituir uma possível explicação para a baixa eficiência do sistema, considerando que organismos vivos tendem a adotar estratégias que favoreçam a sua sobrevivência.

Este trabalho comprovou que a Integrase 13 pode ser produzida por *B. subtilis* e que apresenta atividade funcional nesta bactéria. Até o momento, não havia registros da produção ou atividade dessa enzima por *B. subtilis*. As Serina Integrases têm sido amplamente exploradas em diferentes aplicações biotecnológicas, destacando-se como ferramentas versáteis em sistemas de biologia sintética. Yang *et al.*, (2015) foram os responsáveis pela identificação da Integrase 13 e da comprovação de sua produção por bactérias, desenvolvendo um circuito de memória em *E. coli*. Já Franco, *et al.* (2023) empregaram a Integrase 13 na construção de um biossensor no qual a enzima, produzida *in vitro*, foi responsável por converter o sinal analógico em uma resposta digital. Por sua vez, Gomide, *et al.* (2020) demonstraram que a Integrase 13 pode ser produzida por células eucarióticas, utilizando células de fibroblastos bovino e a linhagem de célula embrionária de rim humano (HEK 293T), e em protoplastos vegetais como modelos experimentais. Nesses sistemas, a Integrase 13 apresentou desempenho superior em comparação às integrases phiC31 e Bxb1 avaliadas no mesmo estudo.

Neste trabalho, a Integrase 13 foi produzida sob diferentes sistemas de controle de expressão gênica em *B. subtilis*, sua produção foi induzida pelo Sistema de Repressão Catabólica por Carbono e por Quórum Sensing, ambos mostrando-se funcionais nessa tarefa. Além disso, verificou-se que tanto promotores considerados fracos em *B. subtilis*, como o SP130, quanto promotores fortes, como P_{srfA} e TP2, foram capazes de promover a transcrição do gene que codifica a Integrase 13, resultando em recombinação nos sítios

específicos.

Portanto, a Integrase 13 viabilizou o desenvolvimento de uma plataforma de produção de proteínas heterólogas em *B. subtilis*, capaz de modular a fase do crescimento celular em que genes correspondentes serão expressos. Essa estratégia previne efeitos adversos sobre o crescimento bacteriano e elimina a necessidade de adição de moléculas indutoras de expressão gênica, como IPTG, que podem elevar consideravelmente os custos do processo produtivo (Baets, *et al.*, 2024). Com isso, a Integrase 13 mostra-se como uma ferramenta promissora para a construção de sistemas heterólogos de expressão, atuando na ativação ou repressão de genes que codificam moléculas de interesse biotecnológico.

B. subtilis apresenta sistemas de secreção naturais, sendo os sistemas Sec e Tat, mediados por peptídeo-sinal, os predominantes. As proteínas exportadas através do Sistema Sec são secretadas antes de atingirem sua conformação final, o que ocorre após a exportação. O contrário é observado para as proteínas secretadas através do Sistema Tat, as quais já são secretadas na sua forma enovelada.

Há uma grande variedade de peptídeos-sinal que sinalizam a secreção de proteínas por *B. subtilis*. Diversos trabalhos foram realizados aplicando estes peptídeos na exportação de diferentes proteínas. Entretanto, a estrutura do peptídeo-sinal, assim como da proteína, interfere na eficiência da exportação. A hidrofobicidade do peptídeo-sinal é um fator importante para a sua eficiência de exportação, sendo que peptídeos-sinais que apresentam maior hidrofobicidade são mais eficientes. Além disso, foi constatado que a interação entre peptídeo-sinal e proteína a ser exportada também influencia na eficiência de exportação. Nesse sentido, grupos de pesquisa que avaliaram os mesmos peptídeos-sinais em diferentes proteínas relataram distintos candidatos como os mais eficientes, dependendo da proteína alvo. Por exemplo, Zhu *et al.* (2024) desenvolveram uma biblioteca de peptídeos-sinais do sistema Sec, adquiridos de um kit comercializado pela Takara Bio, para avaliar a exportação de α -Lactalbumina por *B. subtilis* e identificaram o peptídeo-sinal YjcN como o mais eficiente. De modo semelhante, Miao *et al.* (2021), ao utilizarem a mesma biblioteca para analisar a

secreção da α -Amilase DL3-4-1 por *B. subtilis*, observaram que o peptídeo-sinal YomL apresentou maior eficiência. Já Zhang *et al.* (2022) avaliaram a exportação da Pullulanase, pela mesma bactéria, e identificaram o peptídeo-sinal amyE como o mais adequado. Esses resultados evidenciam que a escolha do peptídeo-sinal ideal depende fortemente da proteína a ser secretada.

A ampla variedade de trabalhos que avaliaram a eficiência da mesma biblioteca de peptídeos-sinal, mas que obtiveram resultados distintos em função da proteína alvo, evidencia de forma clara a influência intrínseca da própria proteína na eficiência de sua exportação. Esse aspecto constitui uma limitação relevante para a produção e secreção de proteínas mediada por peptídeos-sinais, uma vez que, para cada nova proteína, torna-se necessário construir e testar uma biblioteca de peptídeos-sinais a fim de identificar o mais eficiente. Isto é um importante limitante para a produção e exportação de proteínas mediada por peptídeo-sinal, pois a cada nova proteína deve ser construída uma biblioteca de peptídeos-sinal a fim de identificar o mais eficiente.

Além disso, dificilmente esta biblioteca irá englobar todos os peptídeos-sinais disponíveis, o que impossibilita a garantia de que não existe nenhum outro peptídeo-sinal mais eficiente que o identificado como o melhor para a exportação de determinada proteína. Isto impossibilita o desenvolvimento de uma plataforma padronizada para a produção e exportação de proteínas recombinantes no organismo de interesse. Com isso, um Sistema de Lise Programada apresenta-se como uma estratégia promissora para superar essa limitação, viabilizando o desenvolvimento de plataformas mais robustas e universais para a produção de biomoléculas.

Os Sistemas de Lise Programada altamente eficientes ainda são inéditos em *B. subtilis*. Entretanto, Diao, *et al.* (2021) desenvolveram um Sistema de Lise Programada em *E. coli*. Esse sistema foi baseado na proteína ColM, responsável por promover a lise celular, fusionada a um peptídeo-sinal. Para o controle da ação desta proteína, a sequência do peptídeo-sinal foi fusionada ao sítio de reconhecimento da protease TEVp. Dessa forma, a produção de TEVp resulta na degradação de ColM. Para a regulação da produção de TEVp, foi desenvolvido um *switch* programado contendo os genes que codificam as

proteases TEVp e TVMVp. Neste regulador, as regiões N-terminais das proteases foram fusionadas a sítios de clivagem específicos de forma que a produção de TEVp só é ativada quando TVMVp for totalmente degradada. Assim, enquanto TEVp promove a degradação de ColM, a degradação de TEVp, por sua vez, permite a lise celular. Portanto, este trabalho comprovou a viabilidade do desenvolvimento de Sistemas de Lise Programada em bactérias, evidenciando sua relevância, uma vez que a concentração da proteína de interesse no meio extracelular foi 335% maior que a observada para a linhagem que não continha o sistema.

Xia, *et al.* (2025) desenvolveram um sistema para produção e liberação de celobiose 2-epimerase em *B. subtilis* com base no Sistema de Quórum Sensing LuxRI e na atividade da Peptidoglicano Hidrolase de *B. subtilis*, LytC. Nesse modelo, a lise celular ocorre após a população bacteriana atingir a densidade crítica necessária para ativar o sistema LuxRI. O estudo demonstrou que, após o cultivo da linhagem que contém o sistema de lise, 70,21% da celobiose 2-epimerase estava no meio extracelular em comparação a 55,37% observados no controle negativo. O mesmo sistema foi posteriormente aplicado para a produção e secreção de PETase e Glicose Desidrogenase (GDH). Com relação à PETase, o controle negativo apresentou 69,62% da enzima no meio extracelular enquanto a linhagem que contém o sistema de lise aumentou este valor para 81,29%. De forma semelhante, para GDH, o controle apresentou 76,67% de enzima no meio extracelular, enquanto a linhagem contendo o sistema atingiu 83%. Esses resultados confirmam a funcionalidade do sistema de lise programada em *B. subtilis*; contudo, os ganhos observados na liberação extracelular de proteínas, embora significativos, foram relativamente modestos, evidenciando a necessidade de otimização para alcançar maior eficiência.

Assim, o desenvolvimento de um Sistema de Lise Programada em *B. subtilis* apresenta-se como uma estratégia de grande relevância, uma vez que possibilita a liberação da proteína de interesse diretamente no meio extracelular, eliminando os custos associados aos processos de rompimento celular empregados para a extração e recuperação da biomolécula. No presente estudo, o Sistema de Lise Programada não apresentou o desempenho esperado.

Contudo, a substituição do Operon 14-15 por outras enzimas endógenas de *B. subtilis*, como LytC, LytD ou LytE, ou ainda pela combinação de diferentes enzimas líticas, configura uma alternativa promissora para a otimização desse sistema (Zhao *et al.*, 2028). Além disso, neste trabalho, foi comprovada a produção e a atividade da Integrase 13, a qual representa um avanço significativo. Essa enzima poderá integrar sistemas de expressão heterólogos em *B. subtilis* e, potencialmente, compor futuros Sistemas de Lise Programada.

6. Conclusões

Neste trabalho, foi desenvolvido um Sistema de Lise Programada em *B. subtilis*. Duas versões deste sistema foram testadas, uma delas baseada no Sistema de Repressão Catabólica por Carbono e a outra responsiva ao Sistema de Quórum Sensing, ambas têm como base a ação da Integrase 13 e das enzimas Holina e Peptidoglicano Hidrolase. Além disso, foram realizadas otimizações neste sistema através da regulação da força dos promotores e RBSs dos genes que o compõem. A versão do sistema que causou a lise celular em algum nível foi a responsiva a Repressão Catabólica por Carbono e na qual os genes que codificam a Integrase 13 e as enzimas de lise têm suas transcrições reguladas por promotores fortes TP2 e P_{veg} , respectivamente, e a sequência adjacente ao RBS do gene que codifica a Peptidoglicano Hidrolase teve 3 nucleotídeos deletados o que aumentou a taxa de tradução do mesmo.

Além disso, foi demonstrado que a Integrase 13 foi produzida por *B. subtilis* e apresentou atividade funcional, fato inédito até o momento para esta bactéria. Dessa forma, a Integrase 13 mostra-se promissora para aplicação em controle de sistemas de expressão heteróloga em *B. subtilis*, uma vez que é capaz de modular a expressão gênica, seja por repressão ou indução.

Apesar das diversas tentativas de otimização, o Sistema de Lise Programada não atingiu ainda o nível almejado. Os resultados indicam que a primeira parte do sistema, envolvendo a ativação da expressão do gene da Integrase 13, seja por alívio da repressão catabólica ou por indução baseada em Quórum Sensing, funcionou bem. Também, a Integrase 13 apresentou atividade catalítica, resultando na inversão da sequência do Operon14-15 no genoma da maior parte da população, ainda que uma porção das células tenha mantido o sentido inicial de codificação. Assim, a única parte do sistema que apresentou falha foi a atividade das enzimas Holina e Peptídeoglicano Hidrolase. Resta ainda saber se essas enzimas não estão sendo produzidas em quantidade suficiente, ou se não estão ativas na célula após a síntese.

Referências Bibliográficas

AGBANGBAA, C. E.; AIDEA, E. S.; HONFOA, H.; KAKAIA, R. G. On the use of post-hoc tests in environmental and biological sciences: A critical review. **Cell Press**, v.10, p. 1-12, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25131.

ASHOUR, L. A review of user-friendly freely-available statistical analysis software for medical researchers and biostatisticians. **Research Statistics**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2024. DOI: 10.1080/27684520.2024.2322630.

BACHMAN, J. Site-Directed Mutagenesis. In: **LORSCH, J. Methods in Enzymology**. Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA. Academic Press, 2013, p. 241-248.

BAETS, J.; PAEPE, B.; MEY, M. Delaying production with prokaryotic inducible expression systems. **Microbial Cell Factories**, v. 23, p. 1-22, 2024. DOI: 10.1186/s12934-024-02523-w.

BRON, S.; MEIMA, R.; DIJL, J. M. V.; WIPAT A.; HARWOOD, C. R. Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* species. In: Harwood C. R. Molecular Biological Methods for *Bacillus* (2nd ed). Estados Unidos: **American Society for Microbiology (ASM) Press**, 1999. p. 392-416.

CHANG, A. Y.; CHAU, V. W. Y.; LANDAS, J. A.; Pang, Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. **JEMI Methods**, v.1, p. 22-25, 2017.

CORRÊA, G.G., LINS, M R. C. R.; SILVA, B.F.; PAIVA, G. B.; ZOCCA, V.F. B.; RIBEIRO, N.V.; PICHELI, F.P.; MACK, M.; PEDROLI, D.B. A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p.326-334, 2020. DOI: 10.1016/j.ymben.2020.03.012.

DIAO, W.; GUO, L.; DING, Q.; GAO, C.; HU, G.; CHEN, X.; LI, Y.; ZHANG, L.; CHEN, W.; CHEN, J.; LIU, L. Reprogramming microbial populations using a programmed lysis system to improve chemical production. **Nature Communications**, v. 12, n. 6886, p. 1-14, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-27226-3.

FOOL, J. L.; KITANO, S.; SUSANTO, A. V.; JIN, Z.; LIN6, Y.; LUO, Z.; HUANG6, L.; LIANG, Z.; MITCHELL, L. A.; YANG, K.; WONG, A.; CAI, Y.; CAI, J.; STRACQUADANIO, G.; BADER, J. S.; BOEKE, J. D.; DAI J.; CHANG, M. W. Establishing chromosomal design-build-test-learn through a synthetic chromosome and its combinatorial reconfiguration. **Cell Genomics**, v. 3, n. 11. 2023. DOI: 10.1016/j.xgen.2023.100435.

FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; SANTOS, V. B.; RESQUE, I. S. A novel

digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone. **Food Chemistry**, v. 338, p.1-7, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127800.

FRANCO, R. A. L.; BRENNER, G.; ZOCCA, V. F. B.; 1, PAIVA, G. B.; LIMA, R. N.; RECH, E. L.; LINS, M. R. C.; PEDROLI, D. B. Signal-amplification for cell-free biosensors, an analog-to-digital converter. **ACS Synthetic Biology**, v. 12, n. 10, p. 2819-2826, 2023. DOI: 10.1021/acssynbio.3c00227.

GARCÍA, B.; FERNÁNDEZ-MANTECA, M. G.; GÓMEZ-GALDÓS, C.; ÁLVAREZ, S. D.; MONTEOLIVA, A. P.; LÓPEZ-HIGUERA, J. M.; ALGORRI, J. F.; OCAMPO-SOSA, A. A.; RODRÍGUEZ-COBO, L.; COBO, A. Integration of Fluorescence Spectroscopy into a Photobioreactor for the Monitoring of Cyanobacteria. **Biosensors**, v.15, p. 1-21, 2025. DOI: 10.3390/bios15030128.

GOMIDE, M. S.; SALES, T. T.; BARROS, L. R. C.; LIMIA, C. G.; OLIVEIRA, M. A.; FLORENTINO, L. H.; BARROS, L. M. G.; ROBLEDO, M. L.; JOSÉ, G. P. C.; ALMEIDA, M. S. M.; LIMA, R. N.; REHEN, S. K.; LACORTE, C.; MELO, E. O.; MURAD, A. M.; BONAMINO, M. H.; COELHO, C. M.; RECH, E. Genetic switches designed for eukaryotic cells and controlled by serine integrases. **Communications Biology**, v.3, n. 255, p. 1-14, 2020. DOI: 10.1038/s42003-020-0971-8.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews, Microbiology**, v. 6, p. 613-624, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1932.

GUIZIOU, S.; SAUVEPLANE, V.; CHANG, H. J.; CLERTE, C.; DECLERCK, N.; JULES, M.; BONNET, J. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 15, p. 7495-508, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw624.

GULIY, O. I.; EVSTIGNEEVA, S. S. Bacteria- and Phage-Derived Proteins in Phage Infection. **Frontiers in Bioscience Landmark**, v. 30, n. 2, p. 1-22, 2025. DOI: 10.31083/FBL24478.

KATSILEROS, A.; ANTONETSIS, N.; MOUZALDIS, P.; TANI, E.; BEBELI, P. J.; KARAGRIGORIOU, A. A comparison of tests for homoscedasticity using simulation and empirical data. **Communications for Statistical Applications and Methods**, v. 31, p. 1-35, 2024. DOI: 10.29220/CSAM.2024.31.1.001.

KHANAL, O.; LENHOFF, A. Developments and opportunities in continuous biopharmaceutical manufacturing. **MABS**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2021. DOI: 10.1080/19420862.2021.1903664.

LIU, D.; MAO, Z.; GUO, J.; WEI, L.; MA, H.; TANG, Y.; CHEN, T.; Wang, Z.; Zhao, X. Construction, Model-Based Analysis, and Characterization of a Promoter Library for Fine-Tuned Gene Expression in *Bacillus subtilis*. **ACS**

Synthetic Biology, v. 7, p. 1785-1797, 2018. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00115.

LIU, Y.; LIU, L.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Synthetic Biology Toolbox and Chassis Development in *Bacillus subtilis*. **CellPress Reviews**, v. 35, n. 5, p.548-562, 2018. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.005.

LOVE, J.; SELKER, R.; MARSMAN, M.; JAMIL, T.; DROPMANN, D.; VERHAGEN, J.; LY, A.; GRONAU, Q. F.; ŠMÍRA, M.; EPSKAMP, S.; MATZKE, D.; WILD, A.; KNIGHT, P.; ROUDER, J. N.; MOREY, R. D.; WAGENMAKERS, E.-J. JASP: Graphical Statistical Software for Common Statistical Designs. **Journal of Statistical Software**, v. 88, p. 1-17, 2019. DOI: 10.18637/jss.v088.i02.

MAGESHWARAN, V.; INMANN, F.; HOLMES L.D. Growth Kinetics of *Bacillus subtilis* in Lignocellulosic Carbon Sources. **International Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 570-574, 2014. ISSN: 0975-5276.

MEYER, F. M.; JULES, M.; MEHNE, F. M. P.; COQ, D. L.; LANDMANN, J. J.; GÖRKE, B.; AYMERICH, S.; STÜLKE, J. Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 24, p. 6939-6949, 2011. DOI: :10.1128/JB.06197-11.

MEIJER, W. J. J.; HORCAJADAS, J. A.; SALAS, M. Phi29 Family of Phages. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p.261-287, 2001. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.261-287.2001.

MERRICK, C. A.; ZHAO, J.; ROSSER, S. J. Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, p. 299-310, 2018. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00308.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry Washington**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

OVERKAMP, W.; BEILHARZ, K.; WEME, R. D. O.; SOLOPOVA, A.; KARSENS, H.; KOVACS, A.; KOK, J.; KUIPERS, O. P.; VEENING, J. W. Benchmarking various green fluorescent protein variants in *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Lactococcus lactis* for live cell imaging. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 20, p. 6481-6490, 2013. DOI: 10.1128/AEM.02033-13.

PANDE, A. H.; PRASAD, Y. R.; ANAKHA, J. What are biopharmaceuticals?. **Exploration of Drug Science**, v. 3, p. 1-12, 2025. DOI: 10.37349/eds.2025.100880.

POPP, P. F.; DOTZLER, M.; RADECK, J.; BARTELS, J.; MASCHER, T. The

Bacillus BioBrick Box 2.0: expanding the genetic toolbox for the standardized work with *Bacillus subtilis*. **Nature Scientific Reports**, v. 7, Article number: 15058, 2017. DOI: 0.1038/s41598-017-15107-z.

MIAO, H.; JIANG, R.; HAN, N.; MA, Y.; WU, Q.; MU, Y.; HUANG, Z. Enhanced extracellular expression of α -Amylase DL3-4-1 in *Bacillus subtilis* via systematic screening of optimal signal peptides. **Process Biochemistry**, v. 108, p. 176-184, 2021. DOI: 10.1016/j.procbio.2021.06.018

MONTER-POZOS, A.; GONZÁLEZ-ESTRADA, E. On testing the skew normal distribution by using Shapiro–Wilk test. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, v. 440, p. 1-16, 2024. DOI: 10.1016/j.cam.2023.115649.

RADECK, J.; KRAFT, K.; BARTELS, J.; CIKOVIC, T.; DURR, 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. 1, p. 29-45, 2013. DOI: 10.1186/1754-1611-7-29.

REUß, D RATH, H.; THÜRMER, A.; BENDA, M.; DANIEL, R.; VÖLKER, U.; MÄDER, U.; COMMICHAU, F. M.; STÜLKE, J. Changes of DNA topology affect the global transcription landscape and allow rapid growth of a *Bacillus subtilis* mutant lacking carbon catabolite repression. **Metabolic Engineering**, v. 45, p.171-179, 2018. DOI: 10.1016/j.ymben.2017.12.004.

RIBEIRO, A. L. J. L.; PÉREZ-ARNAIZ, P.; SÁNCHEZ-COSTA, M.; PÉREZ, L.; ALMENDROS, M.; VLIET, L. V.; GIELEN, F.; LIM, J.; CHARNOCK, S.; HOLLFELDER, F.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E.; BERENGUER, J.; HIDALGO, A. Thermostable in vitro transcription-translation for enzyme screening in microdroplets. **BioRxiv**, p. 1-46, 2024. DOI: 10.1101/2024.02.22.580490

RUIZHTTIPS, N.; SILHAVY, T. J. How *Escherichia coli* Became the Flagship Bacterium of Molecular Biology. **Journal of Bacteriology**, v. 204, p. 1-9, 2022. DOI: 10.1128/jb.00230-22.

SALIS, H. M. The Ribosome Binding Site Calculator. In: VOIGT, C. Methods in Enzymology (1st ed). Estados Unidos: **American Press**, 2011. p.19-42.

REIS, A. C.; SALIS, H. M. An Automated Model Test System for Systematic Development and Improvement of Gene Expression Models. **ACS Synthetic Biology**, v. 9, p. 3145-3156, 2020. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00394.

SINGH, K. D.; SCHMALISCH, M. H.; STÜLKE, J.; GÖRKE, B. Carbon Catabolite Repression in *Bacillus subtilis*: Quantitative Analysis of Repression Exerted by Different Carbon Sources. **Journal of Bacteriology**, v.190. n. 21, p. 7275-7284, 2008. DOI: 10.1128/JB.00848-08.

TEIXEIRA, G. G.; SANTOS, P. M. Simple and cost-effective approaches for quantification of reducing sugar exploiting digital image analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 113, p. 1-6, 2022. DOI: 10.1016/j.jfca.2022.104719.

TRIPATHI, N. K. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. **ChemBioEng**, v. 3, n. 3, p. 116-133, 2016. DOI: 10.1002/cben.201600002.

VOJCIC, L.; DESPOTOVIC, D.; MARTINEZ, R.; MAURER, K.; SCHWANEBERG, U. An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 487–493, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-3987-2.

WEN, J.; ZHAO, X.; SI, F.; QI, G. Surfactin, a quorum sensing signal molecule, globally affects the carbon metabolism in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 12, p. 1-19, 2021. DOI: 10.1016/j.mec.2021.e00174.

WU, G.; YIN, C.; ZHENG, J.; WANG, M.; ABDALMEGEED, D.; ZHANG, F.; SUN, S.; SUN, S.; SHAO, Y.; XIN, Z. Dynamic regulation of iturin production via reconstructing the quorum-sensing system ComQXPA in *Bacillus subtilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 1-13. DOI: 10.1007/s11274-025-04390-y.

XIANG, Y.; MORAIS, M. C.; BATTISTI, A. J.; GRIMES, S.; JARDINE, P. J.; ANDERSON, D. L.; ROSSMANN, M. G. Structural changes of bacteriophage phi29 upon DNA packaging and release. **EMBO Journal**, v. 25, n. 21, p. 5229–5239, 2006. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601386.

XIA, Q.; SHEN, W.; XIA, Y.; ZHOU, L.; CHEN, X.; YANG, H. Enhanced extracellular production of recombinant cellobiose 2-epimerase in *Bacillus subtilis* via a novel quorum sensing-mediated dynamic regulation system QS-LytC. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 320, p. 1-9, 2025. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.146191.

XU, K.; LI, Y. T. Y.; RAO, J. T. S.; LI, J.; ZHOU, J.; LIU, S. Efficient, Flexible Autoinduction Expression Systems with Broad Initiation in *Bacillus subtilis*. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, p. 3084-3093, 2021. DOI: 10.1021/acssynbio.1c00369.

XU, K.; TONG, Y.; LI, Y.; TAO, J.; RAO, S.; LI, J.; ZHOU, J.; LIU, S. Autoinduction Expression Modules for Regulating Gene Expression in *Bacillus subtilis*. **ACS Synthetic Biology**, v. 11, n. 12, p. 4220–4225, 2022. DOI: 10.1021/acssynbio.2c00304.

YANG, H.; QU, J.; ZOU, W.; SHEN, W.; CHEN, X. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 6607–6626, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11533-2.

YANG, L.; NIELSEN, A. A. K.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, J.; MCCLUNE, C. J.; LAUB, M. T.; LU, T.K.; VOIGT, C. A. Permanent Genetic Memory with >1-Byte Capacity. **Nat Methods**, v. 11, n. 12, p. 1261-1266, 2014. DOI: 10.1038/nmeth.3147.

YANG, Z.; CHEN, Z.; ZHANG, Y. A simple and economical site-directed mutagenesis method for large plasmids by direct transformation of two overlapping PCR fragments. **BioTechniques**, v. 73, p. 227–233, 2022. DOI: 10.2144/btn-2022-0085.

YIN, W.; WANG, Y.; LIU, L.; HE, J. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 1-18, 2019. DOI: 10.3390/ijms20143423.

ZHANG, K.; SU, L.; WU, J. Production in *Bacillus subtilis* Through dltB Disruption and Signal Peptide Optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, p. 1206-1220, 2022. DOI: 10.1007/s12010-021-03617-6.

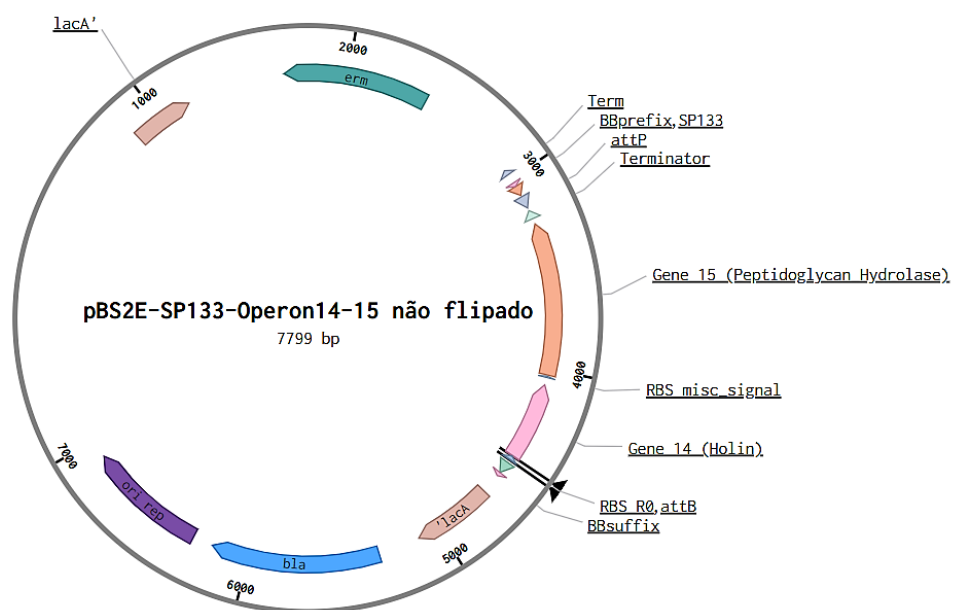
ZHAO, L.; YE, J.; FU, J.; CHEN, G. Engineering peptidoglycan degradation related genes of *Bacillus subtilis* for better fermentation processes. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 238-247, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.134.

ZENG, X.; ZOU, Y.; ZHENG, J.; QIU, S.; LIU, L.; WEI, C. Quorum sensing-mediated microbial interactions: Mechanisms, applications, challenges and perspectives. **Microbiological Research**, v. 273, p. 1-13, 2023. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127414.

ZHU, Y.; SUNA, P.; LIA, C.; ZHANGA, Y.; WANGA, Y.; LIA, J.; LIU, Y.; CHEN, J.; DENG, Y. Enhanced extracellular production of alpha-lactalbumin from *Bacillus subtilis* through signal peptide and promoter screening. **Food Science and Human Wellness**, v. 13, p. 2310-2316, 2024. DOI: 10.26599/FSHW.2022.9250192.

ZONG, H.; ZHANG, L.; CHENG, Y.; SHENG, Z.; ZHUGE, B.; LU, X. Efficient Autoinducible Expression of Recombinant Proteins via the DegSU Quorum Sensing System in a Robust *Bacillus subtilis*. **ACS Synthetic Biology**, v. 14, n. 1, p. 273–284, 2025. DOI: 10.1021/acssynbio.4c00798.

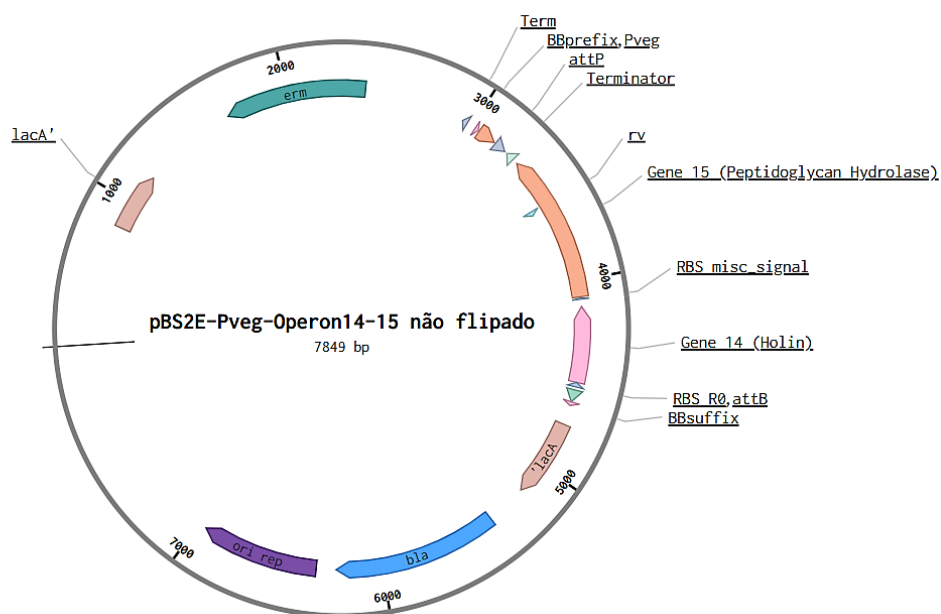
Figura A 1 - Mapa do plasmídeo pBS2E-SP133-Operon14-15.



Fonte: Autora.

Os Operon14-15 está codificado no sentido inverso ao promotor constitutivo SP133 e está flanqueado pelos sítios de reconhecimento da Integrase 13.

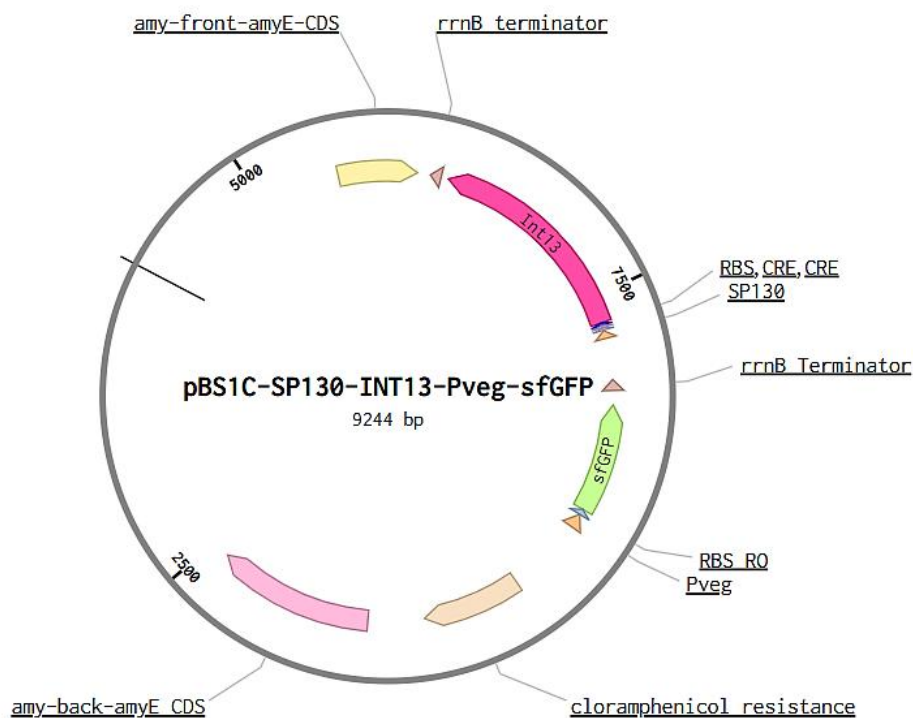
Figura A 2 - Mapa do plasmídeo PpBS2E-P_{veg}-Operon14-15.



Fonte: Autora.

Os Operon14-15 está codificado no sentido inverso ao promotor constitutivo P_{veg} e está flanqueado pelos sítios de reconhecimento da Integrase 13.

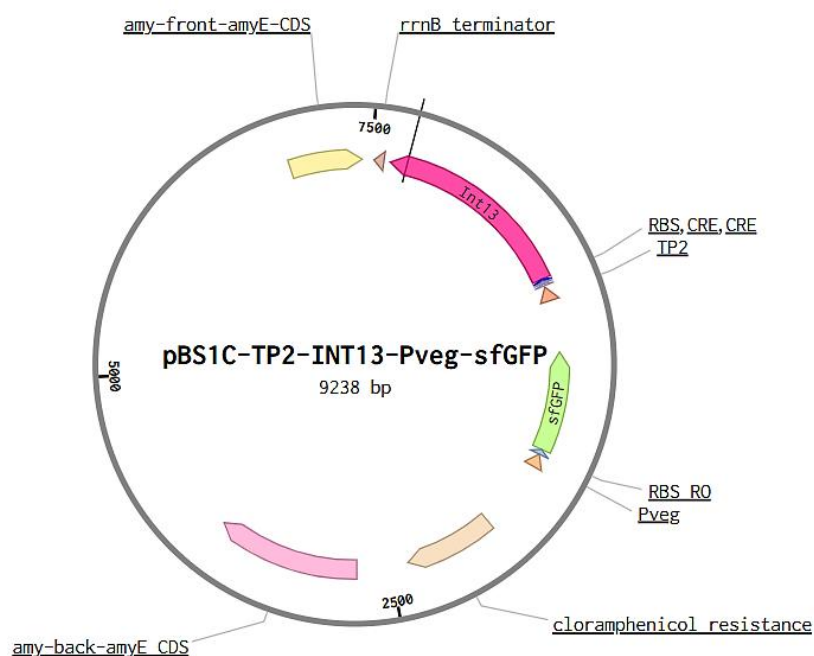
Figura A 3 - Mapa do plasmídeo pBS1C-P_{srfA}-INT13-SP130-sfGFP.



Fonte: Autora.

O plasmídeo apresenta as unidades de transcrição do gene repórter sob controle do promotor P_{veg} e do gene que codifica a Integrase 13, cuja expressão está regulada pelo promotor SP130 e depende do sistema de Repressão Catabólica por Carbono.

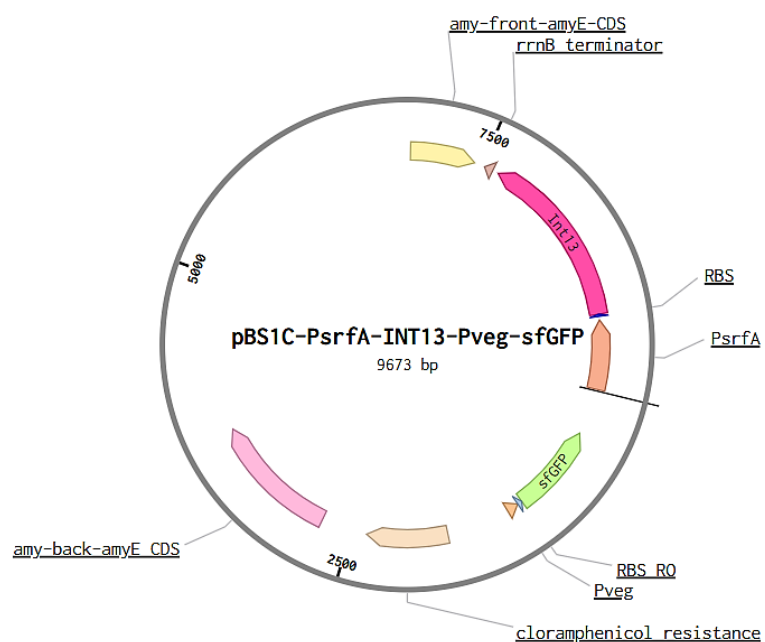
Figura A 4 - Mapa do plasmídeo pBS1C-P_{srfA}-INT13-TP2-sfGFP.



Fonte: Autora.

O plasmídeo apresenta as unidades de transcrição do gene repórter sob controle do promotor P_{veg} e do gene que codifica a Integrase 13, cuja expressão está regulada pelo promotor TP2 e depende do sistema de Repressão Catabólica por Carbono.

Figura A 5 - Mapa do plasmídeo pBS1C-P_{srfA}-INT13-P_{veg}-sfGFP.



Fonte: Autora

O plasmídeo apresenta as unidades de transcrição do gene repórter sob controle do promotor P_{veg} e do gene que codifica a Integrase 13, cuja expressão está regulada pelo promotor P_{srfA} e depende do sistema de Quórum Sensing ComQXPA.