



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

LEONARDO FERRO TAVARES

Otimização de um circuito genético responsivo à glicose

Araraquara - SP

2022

Leonardo Ferro Tavares

Construção de um circuito genético responsivo à glicose

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

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

Araraquara, SP

2022

T657o

Tavares, Leonardo Ferro.

Otimização de um circuito genético responsivo à glicose / Leonardo Ferro Tavares. – Araraquara: [S.n.], 2022.
94 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Biologia sintética. 3. Promotores. 4. Repressão de carbono. 5. Oxidação. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.

Leonardo Ferro Tavares

Construção de um circuito genético responsivo à glicose

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Araraquara, 15 de dezembro de 2022

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Danielle Biscaro Pedrolli

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Mestre Gabriela Barbosa de Paiva

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Mestre Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedicatória

Dedicado à uma criança que um dia sonhou em ser cientista e a todas aquelas que virão depois dela.

O sucesso não é o final, o fracasso não é fatal. É a coragem de continuar que conta.

- *Winston Churchill*

Agradecimentos

Agradeço a Deus o privilégio da existência; a vontade inabalável de vencer com a qual me levanto todos os dias; os valores da persistência, dedicação e o amor ao conhecimento e à verdade com os quais fui moldado ao longo da minha vida; e sobretudo ao Seu amor e amparo espiritual nas horas mais difíceis.

Agradeço aos meus pais, Leila e Sebastião, todo amor e esforço empreendidos na minha educação e formação. Mesmo que muitas vezes não expresse em palavras, o conteúdo construído nessas páginas só foi possível graças aos sacrifícios pelos quais se sujeitaram para que eu vivesse meus sonhos.

Agradeço aos meus avós, Maria Helena e Admar, o amor e por terem sido essenciais na construção da minha imaginação inventiva e dinâmica, pelos passeios a museus, zoológicos, parques culturais e pelos livros de ciência que sempre me cativaram e que me levaram ao caminho que hoje escolhi seguir.

Agradeço a minha irmã, Marcela, pela amizade, compreensão e apoio dado no momento em que iniciei meus estudos acadêmicos. Sei das coisas que abriu mão e das dificuldades que enfrentou em um primeiro momento.

Agradeço a Keryn Natani de Melo Oliveira a amizade, o apoio e carinho. Você foi uma companhia maravilhosa ao longo da maior parte da minha vida acadêmica, e uma amiga para vida toda.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Danielle Biscaro Pedrolli, por ter me aceito como seu aluno de iniciação científica, enxergando em mim o potencial e as qualidades necessárias para pesquisa científica. E sobretudo, por ter tido paciência quando as coisas nem sempre davam certo.

Agradeço ao técnico do departamento, Flávio Pereira Picheli, a imensurável ajuda ao longo do meu processo de aprendizado, pela paciência e sempre pronta disponibilidade em sanar qualquer dúvida, por mais simples que fosse.

Agradeço a equipe SynBio pelo apoio no meu processo de aprendizado, pelas ideias compartilhadas e pela relação construída ao longo dos anos de convivência.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP e ao *campus* de Araraquara pelo empenho empreendido na minha formação e pela estrutura de qualidade na qual pude desenvolver as competências de um engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro dado ao meu projeto.

Resumo

A microbiota humana desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde de seu hospedeiro, sendo muitas patologias associadas a desequilíbrios dessa microbiota. Um dos tipos de microrganismos existentes na microbiota intestinal humana são os probióticos, os quais possuem atividade benéfica ao nosso organismo, sendo a sua existência muito importante. Nos últimos anos, as pesquisas de biologia sintética voltadas para a criação de probióticos mais eficientes, os chamados probióticos terapêuticos vem ganhando força. Esse projeto visa a otimização de um circuito genético responsivo à glicose, no qual a presença de glicose no organismo gere uma resposta identificável. Esse circuito foi caracterizado em *Bacillus subtilis*, um chassi probiótico com grande potencial de uso na biologia sintética. O objetivo desse projeto foi corrigir as falhas de um circuito regulatório previamente construído a fim de torná-lo mais eficiente menos susceptível a vazamentos, permitindo alto nível de expressão quando ativado. Como resultados foram obtidos dois novos promotores com alto grau de sofisticação na regulação metabólica para aplicação em *B. subtilis*: Pveg-cre e Pveg-tetO. Ambos foram bem caracterizados em diferentes fontes de carbono, mostrando-se sensíveis, robustos e modulares. Isso foi provado não só com os resultados individuais, mas com a construção de um biosensor formado pela construção de um circuito genético regulado pelos dois promotores concomitantemente. O biosensor também foi caracterizado em diferentes fontes de carbono e mostrou-se confiável e sensível em todas as situações testadas.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, *Biologia sintética*, *Promotores* , *Repressão de carbono*.

Abstract

The human microbiota plays a fundamental role in maintaining the health of its host, and many pathologies are associated with imbalances in this microbiota. One of the types of microorganisms existing in the human intestinal microbiota are probiotics, which have beneficial activity to our body, and their existence is very important. In recent years, synthetic biology research aimed at creating more efficient probiotics, the so-called therapeutic probiotics, has been gaining momentum. This project aims to optimize a glucose-responsive genetic circuit, in which the presence of glucose in the body generates an identifiable response. This circuit was characterized in *Bacillus subtilis*, a probiotic chassis with great potential for use in synthetic biology. The objective of this project was to correct the flaws of a previously built regulatory circuit in order to make it more efficient and less susceptible to leaks, allowing a high level of expression when activated. As a result, two new promoters with a high degree of sophistication in metabolic regulation were obtained for application in *B. subtilis*: Pveg-cre and Pveg-tetO. Both were well characterized in different carbon sources, showing to be sensitive, robust and modular. This was proved not only with the individual results, but with the construction of a biosensor formed by the construction of a genetic circuit regulated by the two promoters concomitantly. The biosensor was also characterized in different carbon sources and proved to be reliable and sensitive in all tested situations.

Key words: *B. subtilis*; synthetic biology; promoters, carbon repression

Lista de ilustrações e figuras

Figura 1 - Sistema de Repressão Catabólico de Carbono em <i>B. subtilis</i> e outros Firmicutes.....	23
Figura 2 - esquema da construção de um plasmídeo recombinante a partir de um inserto e um vetor frontais, utilizando sítios de restrição e padrão de montagem BioBrick (KNIGHT, T., 2003).....	25
Figura 3 - Biossensor responsivo à glicose, baseado nos promotores Pveg-cre e Pveg-tetO, ambos responsivos ao sistema de repressão catabólico de carbono.....	29
Figura 4 - Montagem do promotor Pveg-cre utilizando oligos anelados. A) Anelamento e PCR de preenchimento. B) Inserto anelado e preenchido. C) Digestão e geração de extremidades coesivas.....	32
Figura 5 - Representação dos promotores construídos. A: Pveg-cre. B: Pveg-tetO.....	32
Figura 6 - Mapa dos plasmídeos gerados na etapa de montagem dos promotores.....	36
Figura 7 - Resultado do sequenciamento do promotor Pveg-cre.....	38
Figura 8 - Curvas de crescimento para as diferentes linhagens de <i>B. subtilis</i> modificadas com os promotores construídos.....	39
Figura 9 - Emissão de luminescência para os promotores construídos.....	40
Figura 10 - Luminescência/Densidade celular para análise dos promotores.....	42
Figura 11 - Mapa dos plasmídeos construídos: pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP e pBS4S_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP.....	49
Figura 12 - Curvas de crescimento para as diferentes linhagens de <i>B. subtilis</i> modificadas com os circuitos construídos.....	50

Figura 13 - Emissão de luminescência para o biossensor e seus respectivos controles.....	51
Figura 14 - Mapa dos plasmídeos construídos: pBS4S_Pveg- <i>tetO</i> -RBS <i>lux</i> -T7RNAp, pBS4S_Pveg- <i>tetO</i> -RBS <i>lux</i> -T7RNAp e Pveg- <i>cre</i> _TetR	55
Figura 15 - Teste RBS <i>lux</i> em meio LB + glicose 1%.....	57
Figura 16 - Emissão de luminescência e densidade celular para o circuito pBS4S_Pveg- <i>tetO</i> -RBS <i>lux</i> -T7RNAp_Pveg- <i>cre</i> -TetR em <i>B. subtilis</i> PT7 <i>lux</i> em diferentes meios e concentrações de açúcares.....	58
Figura 17 - Emissão de luminescência do biossensor para diferentes fontes de carbono.....	60
Figura 18 - Resultados para diferentes fontes de carbono - Luminescência/OD.....	62
Figura 19 - Caracterização dos promotores e demais circuitos em glicose e glicerol.	65

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Combinações possíveis das enzimas de restrição do padrão BioBrick e os resultados estruturais correspondentes.....	24
Tabela 2 - Oligos utilizados para montagem do promotor Pveg-cre.....	33
Tabela 3 - Plasmídeos utilizados nesta etapa. a) RADECK, J. et al., 2013; b) Registry of Standard Biological Parts (iGEM Foundation).....	34
Tabela 4 - Construções geradas na etapa de Montagem dos promotores.....	35
Tabela 5 - Oligos usados na PCR de colônia para confirmação da linhagem Bs PT7lux.....	45
Tabela 6 - Plasmídeos utilizados na etapa de montagem do circuito. Referências: a) este trabalho; b) RIBEIRO, N.V., 2020; c) derivado de RADECK, J. et al, 2013.	46
Tabela 7 - Oligos utilizados para PCR e geração do inserto Pveg-cre-TetR.....	47
Tabela 8 - Construções geradas na etapa de Montagem do circuito.....	48
Tabela 9 - Construções geradas na etapa de correção do circuito.....	56
Tabela 10 - Composição dos meios usados na etapa de otimização dos meios.....	57
Tabela 11 - Comparação Luminescência/OD - Outras Fontes x Glicose.....	64

Lista de abreviaturas e siglas

ATP - adenosina trifosfato

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

CcpA - proteína de controle catabólico A

cre - *Catabolite Responsive Elements*

DNA - ácido desoxirribonucleico

E. coli - *Escherichia coli*

FPB - frutose-1,6-bifosfato

FW/fw - Forward

Glu - Glicose

Glu-6-P - glicose - 6 - fosfato

GRAS - *Generally regarded as safe*

IBD - Inflammatory Bowel Disease

IL-10 - Interleuchina 10

HPr - proteína histidina

HPV-16 - Papilomavírus humano 16

LB - Luria-Bertani

mL - mililitro

mRNA - RNA mensageiro

pb - pares de base

PTS - Fosfoenolpiruvato-carboidrato fosfotransferase

PW - Power

OD - Optical density

RNA - ácido ribonucleico

RBS - *Ribosome binding site*

RCC - Repressão catabólica por carbono

RV/rv - Reverse

TGI - Trato Gastrointestinal

Tm - Temperatura de Melting

tRNA - RNA transportador

ua - unidades de absorbância

ug - micrograma

uOD - unidade de densidade óptica

Lista de Símbolos

:: - Integrado ao cromossomo

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Objetivos	18
2. Desenvolvimento	19
2.1. <i>Bacillus subtilis</i> e aplicação como probióticos	19
2.2. Repressão Catabólica de Carbono	20
2.2.1. Repressão Catabólica de Carbono em <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.3. BioBrick	23
2.4. Toolbox Genética para <i>Bacillus subtilis</i>	25
2.5. Construção Proposta	27
3. Parte 1 - Construção e teste dos Promotores	30
3.1. Materiais e métodos	30
3.1.1. Meios de cultura	30
3.1.2. Montagem dos promotores	31
3.1.3. Linhagens e Plasmídeos	33
3.1.4. Transformação das linhagens em <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i>	34
3.1.5. Resumo das linhagens usadas e construídas na etapa de montagem dos promotores	35
3.1.6. Sequenciamento	37
3.1.7. Teste de funcionalidade - Luminescência	37
3.1.8. Cultivos	37
3.2. Resultados Parte 1 - Montagem dos Promotores	38
4. Parte 2 – Construção e teste do Circuito genético	46
4.1. Materiais e Métodos	46
4.1.1. Preparo de células competentes de <i>B. subtilis</i> PT7lux	46
4.1.2. Linhagens e Plasmídeos	46
4.1.3. Construção do circuito pBS4S_Pveg-cre_TetR_Pveg-tetO_T7RNAp	47
4.1.4. Outros circuitos	48
4.1.5. Resumo das linhagens usadas e construídas na etapa de montagem	48
4.2. Resultados Parte 2 - Montagem do Circuito	50
5. Parte 3 - Otimizações: Teste RBS/lux e Teste de Meios	54
5.1. Introdução do sítio RBS/lux	54
5.2. Montagem do biossensor pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAp_Pveg-cre-TetR	55

5.3.	Resumo das linhagens usadas e construídas na etapa 3 de correção	56
5.4.	Teste dos Meios	57
5.5.	Resultados Parte 3.1 - RBS/ <i>lux</i>	58
5.6.	Resultados Parte 3.2 - Teste de Meios	59
6.	Parte 4 - Maximização dos resultados e definição da fonte de carbono ideal	61
6.1.	Resultados Parte 4 - Definição de fonte de carbono	61
7.	Parte 5 - Caracterização das partes e do circuito em Glicose e Glicerol	66
7.1.	Resultados Parte 5 - Caracterização em Power com Glicose e Glicerol	66
8.	Conclusão	71
9.	Referências	73
10.	APÊNDICES	78
11.	ANEXOS	88

1. Introdução

O trato gastrointestinal humano é uma matriz rica em microrganismos altamente variados. Estima-se que cerca de mil espécies distintas de microrganismos existam ao longo de todo sistema gastrointestinal, exercendo inúmeras funções e desempenhando papéis importantes na manutenção da saúde humana, em especial, fornecendo nutrientes essenciais, auxiliando na digestão de alimentos, na redução de inflamações e quebra de toxinas que podem estar presentes, promovem hematopoese (formação e caracterização de células sanguíneas), além de atuarem na regulação do sistema imunológico do hospedeiro (ZHOU, 2020).

Dentro desse escopo, existem uma série de distúrbios patológicos decorrentes de desequilíbrios nessa microbiota intestinal. Estudos demonstram que patologias como aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca, doença renal crônica, obesidade, diabetes e câncer estão amplamente associados com essas anomalias no ecossistema intestinal (ZHOU, 2020; SINGH; MAL; MAROTTA, 2017). Obviamente, não só a microbiota natural do trato gastrointestinal tem impacto na saúde dos seres humanos. Destaca-se a dieta dos indivíduos, herança genética, uso de medicamentos como antibióticos e a susceptibilidade do organismo a infecções (ZHOU, 2020).

Nessas situações de desequilíbrio da microbiota intestinal, entram em cena os probióticos. Os probióticos são espécies de microrganismos capazes de prosperar no trato gastrointestinal, onde exibem efeitos positivos e promotores de boa saúde decorrentes de sua ingestão (ZHOU, 2020; GHISHAN; KIELA, 2011). Apesar do conhecimento dos efeitos positivos para a saúde e para restauração da microbiota natural do intestino, o desenvolvimento de probióticos mais eficientes ainda é um desafio.

A biologia sintética vem em auxílio, permitindo que microrganismos sejam modificados geneticamente, ou “engenheirados” de maneira a produzir probióticos com funções terapêuticas que sejam seguros, eficientes e possam desempenhar novas funções distintas das já conhecidas e amplamente aplicadas. O uso de técnicas de biologia molecular e biologia sintética permitiu ao longo dos últimos

anos o desenvolvimento de toda uma nova gama de possibilidades para a criação dos

chamados *designer probiotics* (CHUA et al, 2017, SINGH; MAL; MAROTTA, 2017). Tratam-se de probióticos geneticamente modificados e biologicamente engenheirados com o intuito de fornecer controle sobre a produção, regulação e distribuição de moléculas terapêuticas nos tecidos vivos, de maneira a ajudar no tratamento de doenças e distúrbios provenientes de patologias decorrentes não apenas do desequilíbrio da microbiota intestinal, mas também do metabolismo, como a diabetes (ZHOU, 2020; CHUA et al, 2017).

Estudos nos últimos anos mostram avanços consideráveis no desenvolvimento de probióticos terapêuticos eficientes. Na literatura é relatado o uso de *Lactococcus lactis* modificado geneticamente para tratar IBD em murinos. Nesse estudo, uma variedade de *L. lactis* modificada para expressar a interleucina-10 (IL-10) recombinante demonstrou resultados positivos, reduzindo em cerca de 50% o avanço da colite artificialmente induzida nos modelos murinos estudados (KUMAR et al, 2016). Braat e colaboradores, 2006 relataram da mesma maneira o uso de *L. lactis* para expressar essa mesma IL-10 recombinante no tratamento da doença de Crohn, obtendo resultados positivos. Outros estudos promissores mostraram o uso de *L. lactis* modificado geneticamente para imunização de doenças inflamatórias intestinais e papilomavírus humano (HPV-16) (BENBOUZIANE et al., 2013). Por fim, mas não menos interessante, é descrito na literatura o uso de *L. lactis*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* para tratamento de diabetes tipo 1 em ratos não diabéticos (DUAN; LIU; MARCH; 2015; MA et al., 2014; WEI et al., 2015)

Os *designers probiotics* ainda estão em fase inicial de desenvolvimento e apresentam grande potencial para os próximos anos. Como descrito, os estudos mais promissores nessa área foram realizados ao longo dos últimos cinco anos. No entanto, existe ainda uma série de desafios a serem superados no desenvolvimento de probióticos terapêuticos para que eles avancem no futuro as fases de testes clínicos e possam eventualmente ser comercializados, oferecendo eficiência e segurança (KUMAR et al, 2016).

1.1. Objetivos

O objetivo central deste projeto foi desenvolver e caracterizar dois novos promotores, Pveg-*cre* e Pveg-*tetO*, para expandir a *toolbox* de partes biológicas disponíveis para uso em *B. subtilis*. Ainda, avaliar a funcionalidade desses promotores em um circuito gênico complexo, responsivo a glicose.

2. Desenvolvimento

2.1. *Bacillus subtilis* e aplicação como probióticos

Bacillus subtilis é uma espécie de bactéria gram-positiva amplamente utilizada como chassi para estudos de biologia molecular, genômica e produção de moléculas de interesse econômico em decorrência de muitas de suas propriedades intrínsecas. Pelo carácter gram-positivo, sua membrana celular é mais fina do que a de bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli*, fazendo dele uma opção eficiente quando voltada à produção e secreção de proteínas heterólogas (SU et al., 2020; YANG et al., 2021), é geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (PARK; SCHUMANN, 2015) o que confere a ele preferência nos estudos envolvendo probióticos engenheirados, além de ser facilmente adaptável a uma série de condições ambientais, sendo encontrado majoritariamente em solos, mas também em raízes e outras partes de plantas, fezes de animais e no trato gastrointestinal (TGI) de diversos organismos vivos (EARL; LOSICK; KOLTER, 2008).

O fato do *B. subtilis* ser facilmente encontrado em tratos gastrointestinais levantou o questionamento há alguns anos do potencial desse microrganismo como probiótico, ou seja, como microrganismo associado à funções inerentemente benéficas para manutenção da saúde e bom funcionamento do TGI (HONG; DUC; CUTTING, 2005). Além disso, não somente o *B. subtilis* pode ser encontrado no TGI, como estudos destacaram a possibilidade desse microrganismo desenvolver todo seu ciclo de vida no TGI (TAM et al, 2006; LESER; KNARREBORG; WORM, 2008) atravessando as fases de esporo para célula vegetativa e esporo novamente.

Esse potencial já descoberto como probiótico levantou atenção dos pesquisadores para a potencial manipulação genética de *B. subtilis* com o intuito de gerar probióticos terapêuticos, isto é, um chassi carreador de moléculas ou compostos com ação terapêutica com foco no tratamento de distúrbios e doenças diversos (LEE; KIM; PAIK, 2019). Na extensa literatura analisada por Lee, Kim e Paik (2019), foram destacadas inúmeras influências e impactos da presença de *B. subtilis* no TGI de organismos vivos. Em primeiro lugar, em um estudo liderado por

Duc e colaboradores (2004), foi observado o potencial de diferentes espécies de *Bacillus* permanecerem e desenvolverem um ciclo de vida completo em TGI de murinos por um período médio de 16 dias, onde atuam produzindo substâncias antimicrobianas, ácidos graxos, ácidos orgânicos e modulando o funcionamento da flora intestinal contra hospedeiros de patógenos (LEE; et al, 2015).

Somando-se a todas essas características intrínsecas do *B. subtilis*, ele está muito bem posicionado como o melhor modelo de bactéria gram-positiva para estudos em biologia molecular (BLAZECK; ALPER, 2013; LIU et al., 2018; SU et al., 2020). Nos últimos anos uma extensa biblioteca de partes biológicas, as chamadas BioBricks, foi sendo construída para aplicação específica em *B. subtilis*. Promotores induzíveis ou constitutivos, sítios RBS com diferentes graus de expressão gênica, além de técnicas de manipulação genética direcionadas (RADECK et al., 2013; POPP et al., 2017; LIU et al., 2020; ZOCCA et al., 2022) fazem com que toda uma nova etapa de progresso acelerado na edição gênica de *B. subtilis*, bem como seu uso em aplicações industriais e terapêuticas (probióticos) estejam surgindo. Contudo, apesar dos avanços recentes, ainda assim, *E. coli* e *S. cerevisiae* ainda representam a maior parte dos chassis utilizados em pesquisas de biologia sintética e biologia molecular (NASERI; KOFFAS, 2020), bem como possuem bibliotecas maiores de partes biológicas à disposição.

Para que o *B. subtilis* possa ser melhor empregado em estudos de biologia sintética e aplicado como chassi microbiológico para produção de compostos de valor agregado ou, no caso de pesquisas voltadas a áreas terapêuticas, como chassi probiótico, é necessário que novas partes sejam desenvolvidas para enriquecer sua biblioteca e expandir as possibilidades para construções mais complexas e eficientes.

2.2. Repressão Catabólica de Carbono

A repressão catabólica de Carbono (RCC) é um mecanismo regulatório observado no metabolismo de diversas bactérias. De modo simplificado, é um processo regulatório pelo qual na presença de determinada fonte de carbono preferencial, a expressão de certos genes e rotas metabólicas dependentes de

fontes de carbono secundárias é limitada severamente ou totalmente reprimida (MAGASANIK, 1961; GÖRKE; STÜLKE, 2008).

Um dos exemplos mais notáveis desse mecanismo é a preferência observada por glicose em *E. coli* (MONOD, 1942). No transcorrer das décadas, as pesquisas subsequentes mostraram que essa preferência é algo comum entre microrganismos, sendo a glicose a fonte preferencial de *B. subtilis* (BLENCKE et al., 2003).

Esse mecanismo de regulação gênico é mais comum do que se pode imaginar inicialmente. Estima-se que cerca de 5 a 10% de todos os genes existentes em bactérias estejam em maior ou menor grau sujeitos a esse sistema (BLENCKE et al., 2003; LIU et al., 2005). Sua importância decorre da habilidade do microrganismo utilizar esse mecanismo de regulação de modo a maximizar suas chances de sobrevivência em diferentes condições, aproveitando as diferentes fontes de carbono preferidas para aumentar a velocidade crescimento e muitas vezes para ativar genes associados à virulência.

O sistema RCC apesar de extremamente comum não é idêntico em todos os microrganismos, ficando isso muito claro quando estudado nos organismos modelos *E. coli* e *B. subtilis*. Enquanto em *E. coli* o sistema é mediado pela prevenção de ativação transcricional dos genes catabólicos na presença da glicose, em *B. subtilis* o RCC funciona através da regulação negativa mediada por um complexo proteico repressor formado na presença de glicose (GÖRKE; STÜLKE, 2008).

Para os fins desta revisão, apenas o funcionamento do sistema em *B. subtilis* será analisado.

2.2.1. Repressão Catabólica de Carbono em *Bacillus subtilis*

Como didaticamente explicado na revisão de Görke e Stülke (2008), em *B. subtilis* o sistema RCC é mediado por 4 partes básicas: o fator de transcrição pleiotrópico (CcpA; proteína de controle metabólico A); a proteína HPr (proteína histidina), proveniente do sistema fosfoenolpiruvato-carboidrato fosfotransferase (PTS); a HPr quinase; e os intermediários glicolíticos, nesse caso representados por frutose-1,6-bifosfato e glicose- 6-fosfato.

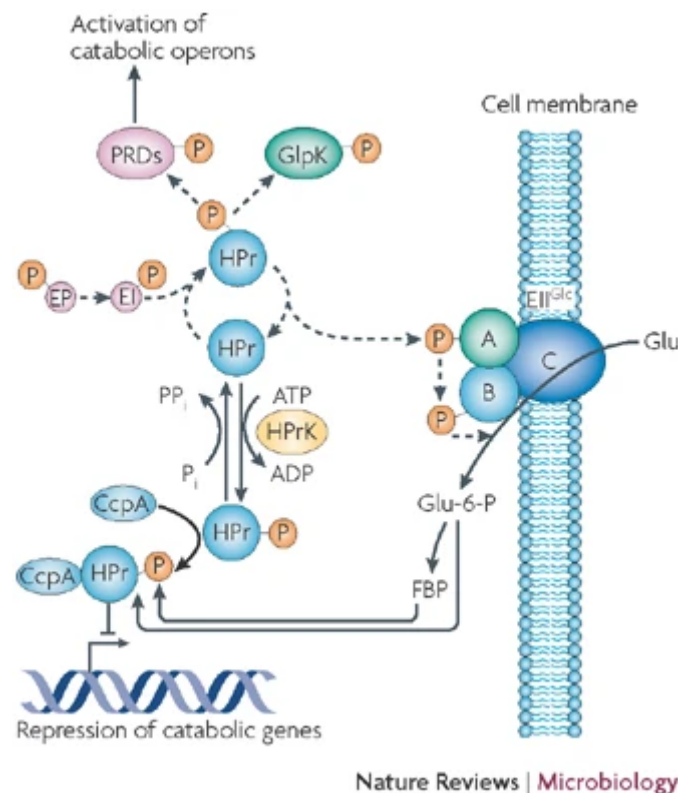
Em *B. subtilis* a proteína HPr é passível de fosforilação na porção Ser46 pela enzima HPr quinase. Essa fosforilação irá ocorrer na presença de altas concentrações de frutose-1,6-bifosfato e ATP no meio intracelular. Altas concentrações dessas duas moléculas destacam a presença de altas concentrações da fonte de carbono preferida, nesse caso, glicose.

A HPr fosforilada possui, intensificada pelos intermediários frutose-1,6-bifosfato e glicose- 6-fosfato, a habilidade de ligar-se à CcpA, atuando como um efetor para essa proteína, desencadeando a formação de um complexo proteico capaz de atuar sobre regiões dos promotores de genes membros do sistema RCC, regulando-os negativamente, inibindo assim suas expressões (DEUTSCHER et al., 1995; JONES et al., 1997). Esses sítios específicos desses promotores são denominados *catabolite responsible element (cre)* (MIWA et al., 2000) e estão localizados geralmente no início das regiões promotoras desses genes, sobrepondo-se muitas vezes à região consenso. Desse modo, a ligação do complexo CcpA-HPr(Ser 46) aos sítios *cre* impede a ligação da RNA polimerase, impedindo a transcrição do gene (CHOI; SAIER JR; MILTON, 2005). Apenas como observação, esta não é a única posição na qual os sítios *cre* podem estar presentes, podendo situar-se também a montante do sítio promotor, e neste caso, o complexo CcpA-HPr(Ser 46) atua como cofator da expressão e não inibidor (GRUNDY et al., 1993).

Essa ligação do complexo CcpA-HPr(Ser 46) ocorre com o DNA, apenas após uma mudança rotacional dos subdomínios amino N-terminal e C-terminal do núcleo da CcpA para uma posição na qual o domínio N-terminal seja passível de ligação à fita de DNA, exatamente na posição dos sítios *cre* (SCHUMACHER et al., 2004).

O sistema geral de regulação pode ser observado em detalhes na Figura 1 abaixo.

Figura 1 - Sistema de Repressão Catabólico de Carbono em *B. subtilis* e outros Firmicutes.



Representação esquemática do mecanismo geral da regulação da expressão gênica observada em *B. subtilis*. Na presença de altas concentrações de Glicose (Glu), haverá também altas concentrações dos intermediários glicolíticos: glicose-6-fosfato (Glu-6-P) e frutose-1,6-bifosfato (FBP), além de ATP. Esses intermediários permitiram a fosforilação da proteína HPr pela ação da HPr quinase. Uma vez fosforilada, ela se liga à proteína CcpA, formando o complexo capaz de inibir a expressão dos genes através da interação dos sítios cre nos promotores.

Fonte: (GÖRKE; STÜLKE, 2008).

2.3. BioBrick

A técnica utilizada para montagem dos promotores, bem como dos circuitos foi inteiramente baseada no padrão BioBrick de montagem de circuitos gênicos desenvolvida por Knight e seus colaboradores (2003). Embora a tecnologia tenha avançado muito e novas variações com mais aplicações e elevados graus de sofisticação tenham sido criadas nos anos seguintes, a totalidade desse projeto foi desenvolvida utilizando-se apenas o padrão clássico baseado nas enzimas *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* e *PstI*.

A montagem de estruturas utilizando o padrão BioBrick é baseada na utilização de um vetor plasmidial contendo em seus flancos 4 sítios específicos para a ação de enzimas de restrição. A montante estão os sítios *EcoRI* e *XbaI*; e a jusante, *SpeI* e *PstI*. Para que a técnica funcione é necessário que o vetor utilizado não possua nenhum outro desses sítios de restrição, além dos que estão flanqueando a sequência regulatória onde as construções serão feitas. Na eventualidade do vetor possuir mais de um destes sítios, eles deverão ser removidos via mutação sítio dirigida.

O posicionamento dos sítios permite que cada vetor seja cortado e ligado de até quatro modos distintos. Para tal, basta apenas utilizá-las em combinações específicas. A depender das enzimas utilizadas será gerado um fragmento denominado inserção, a qual pode ser frontal ou traseira; ou vetores, que também podem ser frontais ou traseiros. As combinações necessárias para cada resultado estão descritas na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1 - Combinações possíveis das enzimas de restrição do padrão BioBrick e os resultados estruturais correspondentes. **Fonte:** Próprio autor

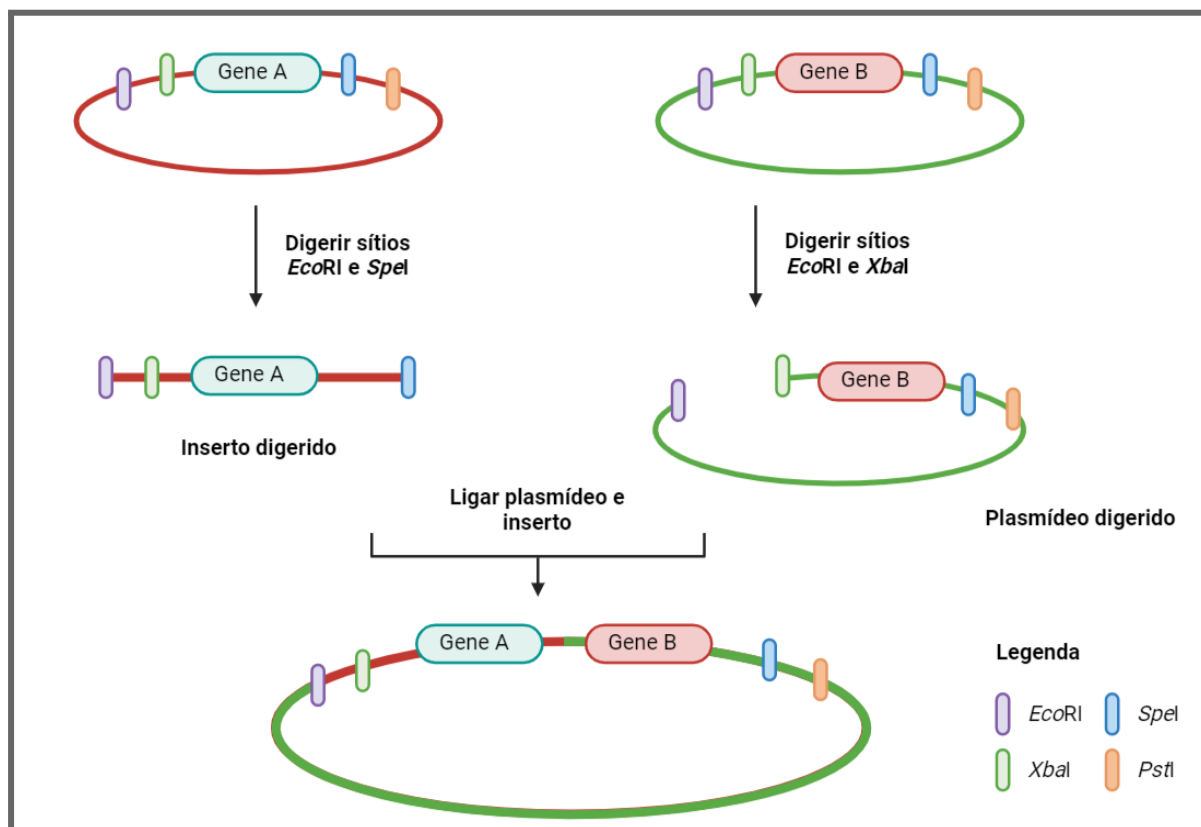
Combinações	Resultado
<i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i>	Vetor frontal
<i>EcoRI</i> e <i>SpeI</i>	Inserção frontal
<i>XbaI</i> e <i>PstI</i>	Inserção traseira
<i>SpeI</i> e <i>PstI</i>	Vetor traseiro

Fonte: Próprio autor.

Após a digestão dos sítios, são geradas extremidades coesivas que permitem a ligação do inserto e do vetor gerados. Insertos frontais podem ligar-se em vetores frontais e insertos traseiros podem ligar-se em vetores traseiros. Uma vez feita a ligação, os sítios de restrição são restaurados as suas sequências originais, permitindo que novas construções sejam feitas no mesmo molde da última utilizando as mesmas enzimas. Facilitando, assim, a construção de circuitos robustos e complexos com baixo grau de dificuldade estrutural. É importante dizer, ainda que na junção dos sítios *XbaI* e *SpeI*, haverá a formação de uma cicatriz de sequência não reconhecida por nenhuma enzima de restrição, impossibilitando um novo corte naquela localização. Abaixo, na Figura 2, tem-se uma representação

esquemática da ligação de um inserto frontal em um vetor frontal, utilizando o padrão descrito.

Figura 2 - esquema da construção de um plasmídeo recombinante a partir de um inserto e um vetor frontais, utilizando sítios de restrição e padrão de montagem BioBrick (KNIGHT, T., 2003).



O esquema representa a digestão de dois plasmídeos. Um deles contendo o Gene A, e outro o Gene B. Nesse exemplo, o plasmídeo contendo o Gene A foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*, gerando um inserto frontal, enquanto o plasmídeo com o Gene B, foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*, gerando um vetor frontal com a capacidade de receber e ligar-se ao inserto devido as extremidades coesivas de ambas as estruturas. Ao final, o plasmídeo recombinante gerado tem os sítios de restrição restaurados e a criação de uma cicatriz *XbaI/SpeI* entre os genes A e B.

Fonte: Próprio autor.

2.4. Toolbox Genética para *Bacillus subtilis*

Como já exposto anteriormente, a existência de peças de construção genéticas padronizadas e bem caracterizadas para construção de circuitos genéticos em *Bacillus subtilis* é um desafio ainda não totalmente superado. No caso

da *E. coli*, são inúmeras as partes já desenvolvidas, com graus de complexidade diversos. Nos últimos anos vários estudos focaram no desenvolvimento de partes biológicas aplicáveis especificamente à *B. subtilis*.

Por exemplo, Radeck e seus colaboradores (2013), publicaram o primeiro relevante conjunto de partes biológicas para essa bactéria. No artigo em questão os autores descreveram a criação de cinco vetores integrativos para o genoma de *B. subtilis* baseados no padrão BioBrick. Três desses vetores possuem a habilidade de serem integrados em apenas um, devido à existência de *locus* de integração específicos. Os outros dois foram desenvolvidos como vetores repórteres capazes de auxiliar na avaliação do uso de promotores de transcrição. Além dos vetores, também foram disponibilizados quatro novos promotores, dois constitutivos e dois induzíveis com graus de expressão em magnitude bastante elevada. Por fim, avaliaram cinco marcadores de epítomos utilizados como N-terminal e C-terminal para GFP.

Já em 2016, um novo estudo expandiu essas partes, caracterizando para aplicação em *B. subtilis* mais uma biblioteca de promotores, mas trazendo como novidade uma biblioteca de três sequências de RBSs (*Ribosome binding site*) e marcadores de degradação de proteínas como forma de melhorar a avaliação da expressão gênica em *B. subtilis* (GUIZIOU et al., 2016).

No ano de 2017, um novo grande avanço, dessa vez com uma nova biblioteca de promotores induzíveis, mais uma geração de vetores vazios com padrão de montagem BioBrick com novos cassetes de resistência à antibióticos e voltados para triagem e testes de avaliação de bibliotecas de RBSs e promotores. Por fim, os autores disponibilizaram novos marcadores baseados em proteínas fluorescentes específicas para *B. subtilis* que cobrem todo o espectro visível (POPP et al., 2017).

Um novo passo foi dado, dessa vez por Liu e colaboradores (2018), onde a primeira biblioteca de promotores totalmente sintéticos, isto é, sem relação dependente com promotores nativos e endógenos de *B. subtilis* foi projetada e publicada baseada em dados de transcriptoma de microarray do genoma de *B. subtilis*. Outra novidade deste estudo está na disponibilização de promotores aplicáveis tanto em regulação positiva, quanto na regulação negativa.

Estes e outros avanços na caracterização de novas partes biológicas para aplicação em *B. subtilis* destacam a crescente importância desta bactéria como chassi biotecnológico e ferramenta de biologia sintética. Outros estudos foram

desenvolvidos nos últimos anos enriquecendo ainda mais a *toolbox*. No entanto, mesmo com a grande variedade de novas partes disponibilizadas, ainda há um enorme *gap* de ferramentas necessárias para maximizar a utilização de *B. subtilis* como chassi.

Mesmo com um elevado número de promotores constitutivos e induzíveis já disponibilizados, há poucas opções disponíveis quando deseja-se partes biológicas com maior grau de refinamento e controle metabólico para aplicação. A realização desse projeto, como descrito no tópico de Objetivos, é voltada para o desenvolvimento de novos promotores aplicáveis em *B. subtilis* que atendam a essa necessidade de partes mais sofisticadas. O modo de fazer isso foi implementar o mecanismo de regulação metabólica da via de repressão catabólica de carbono em promotores específicos para *B. subtilis*. Desse modo, expandindo a *toolbox* e aumentando o leque de opções e aplicações da bactéria.

2.5. Construção Proposta

As construções propostas para solucionar parte desse *gap* de partes biológicas mais sofisticadas para aplicação em *B. subtilis* são dois promotores com controle baseado na repressão catabólica de carbono. Para esse fim, o promotor constitutivo Pveg, já bem caracterizado em *B. subtilis*, foi modificado de duas maneiras distintas.

A primeira delas com a introdução de dois sítios *cre*, gerando o promotor Pveg-*cre*, que como destacado anteriormente são responsivos à regulação negativa do complexo proteico CcpA-HPr(Ser 46), formado na presença de glicose. Ou seja, na presença de glicose, esse complexo irá inibir a ativação desse promotor que contém os sítios *cre* impedindo a transcrição do gene controlado por ele, sendo operacional apenas na ausência de glicose.

O segundo promotor construído foi baseado, da mesma maneira, no promotor constitutivo Pveg, mas dessa vez com a introdução do sítio operador *tetO*, gerando o promotor Pveg-*tetO*. Este sítio operador é regulado pela proteína TetR que, quando presente, bloqueia a transcrição a partir do promotor. Uma vez construídos, testados e bem caracterizados, esses dois promotores foram

empregados em um circuito genético mais complexo que inverte a resposta à glicose em comparação ao promotor Pveg-cre sozinho, ou seja, resulta em ativação da expressão gênica induzida pela glicose, funcionando como um biossensor de glicose.

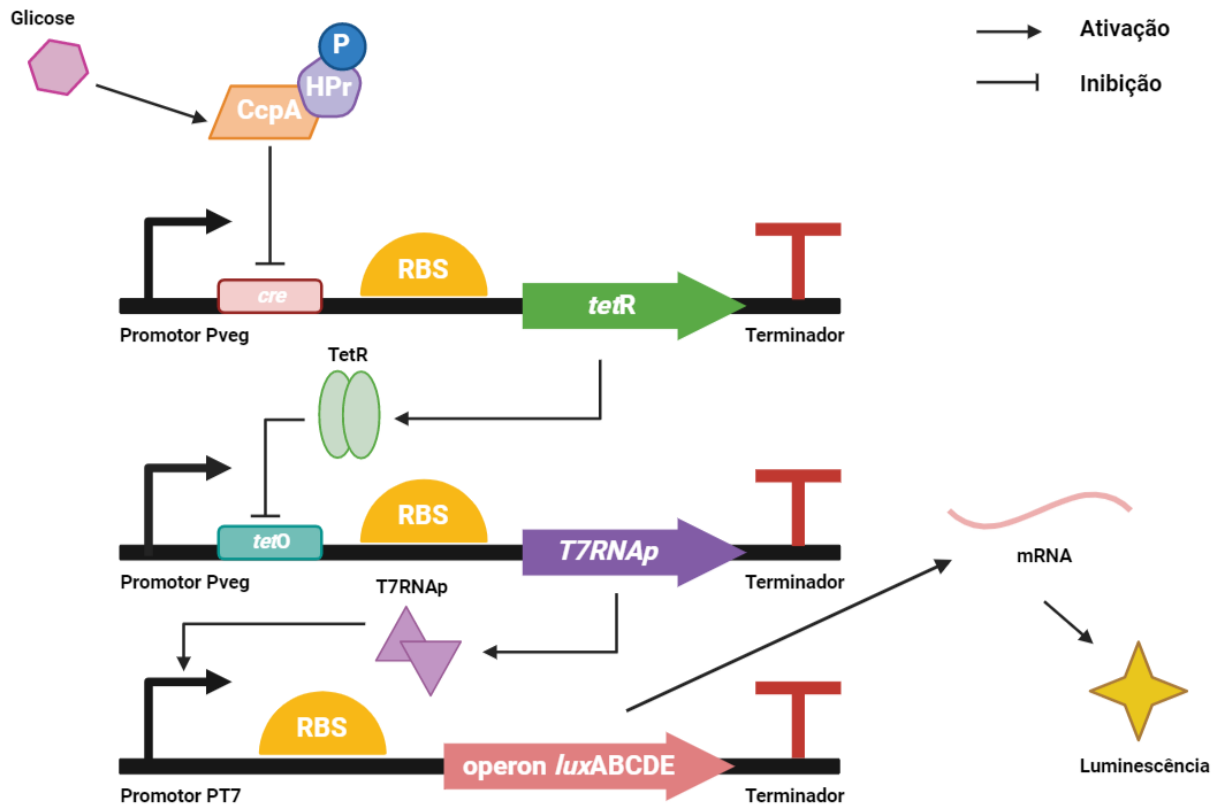
Nessa construção, representada esquematicamente na Figura 3, o gene *tetR*, responsável pela codificação da proteína repressora TetR, é colocado sob controle do promotor Pveg-cre. Nessa situação, na presença de glicose, a formação do complexo proteico CcpA-HPr(Ser 46), o qual interage com os sítios *cre* do promotor Pveg-cre, essa proteína repressora não será sintetizada, pois o promotor não será ativado.

A TetR é capaz de interagir com o sítio *tetO* integrado ao promotor Pveg, reprimindo-o. Sendo assim, na presença de glicose, e como consequência na ausência da proteína TetR, o gene codificante da T7RNAP sob controle do promotor Pveg-*tetO* será expresso.

A T7RNAP é responsável por ativar o promotor PT7, o qual controla a expressão do operon *luxABCDE*, um conjunto de cinco genes controlados pelo mesmo promotor capazes de expressar altos índices de luminescência quando ativados. A luminescência é a forma escolhida de avaliar o funcionamento dos promotores bem como do biossensor projetado.

De forma resumida, na presença de glicose não haverá produção da proteína repressora TetR, havendo portanto transcrição da T7RNAP e expressão do operon *lux*, gerando emissão de luminescência. Na ausência de glicose, a proteína TetR será expressa, reprimindo a expressão da T7RNAP e do operon *lux*, não havendo, assim, emissão de luminescência. O esquema é datilhado na Figura 3.

Figura 3 - Biossensor responsivo à glicose, baseado nos promotores Pveg-cre e Pveg-tetO, ambos responsivos ao sistema de repressão catabólico de carbono.



Na presença de glicose, há formação do complexo proteico CcpA-HPr(Ser 46). O complexo é responsável por inibir o promotor Pveg-cre através da interação com os sítios *cre* presentes. Assim não haverá transcrição da proteína repressora TetR. Dessa maneira, a T7RNAp controlada pelo promotor Pveg-*tetO* será expressa e poderá ativar o promotor PT7, responsável pela expressão dos genes do operon *lux*, responsáveis pela emissão da resposta do biossensor via luminescência. Na ausência de glicose e expressão da TetR, o sistema é reprimido.

Fonte: Próprio autor.

3. Parte 1 - Construção e teste dos Promotores

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Meios de cultura

Nas etapas de construção dos promotores e construção dos circuitos foram utilizados exclusivamente como meio de cultivo o meio “Luria-Bertani” (LB) suplementado com os antibióticos específicos para cada cultivo, mais precisamente 100 ug/ml de ampicilina e 25 ug/ml de cloranfenicol para os cultivos que envolveram o uso de *E. coli* como chassi e 5 ug/ml de cloranfenicol para os cultivos que envolveram *B. subtilis* (apenas promotores) e 5 ug/ml de cloranfenicol e 100 ug/ml de espectiomicina (circuitos). Os meios utilizados eram líquidos para o preparo de inóculos e sólidos (ágar) para transformação. Para as reações de transformação de *E. coli* foram preparadas e usadas alíquotas de meio SOC, enquanto para as transformações de *B. subtilis* foram preparados e usados meios SpC, T base e SpII + EGTA. Para os cultivos, os meios foram suplementados com 1% da fonte de carbono necessária para o experimento. Nesta etapa, glicose e lactose. O modo de preparo de cada um deles está descrito em anexo.

Na Parte 3, de construção dos promotores foram utilizados como meios de cultivo o meio “Luria-Bertani” (LB) e o meio Power (PW) suplementados com 5 ug/ml de cloranfenicol e 100 ug/ml de espectiomicina para os cultivos com *B. subtilis*. Os meios de transformação permaneceram os mesmos. Adicionou-se glicose e lactose como fontes de carbono em concentrações de 1% a 3%.

Nos tópicos 6 e 7, fixou-se o Power como meio utilizado e 3% de fonte de carbono (independente de qual) como suplemento. Os antibióticos permaneceram os mesmos.

3.1.2. Montagem dos promotores

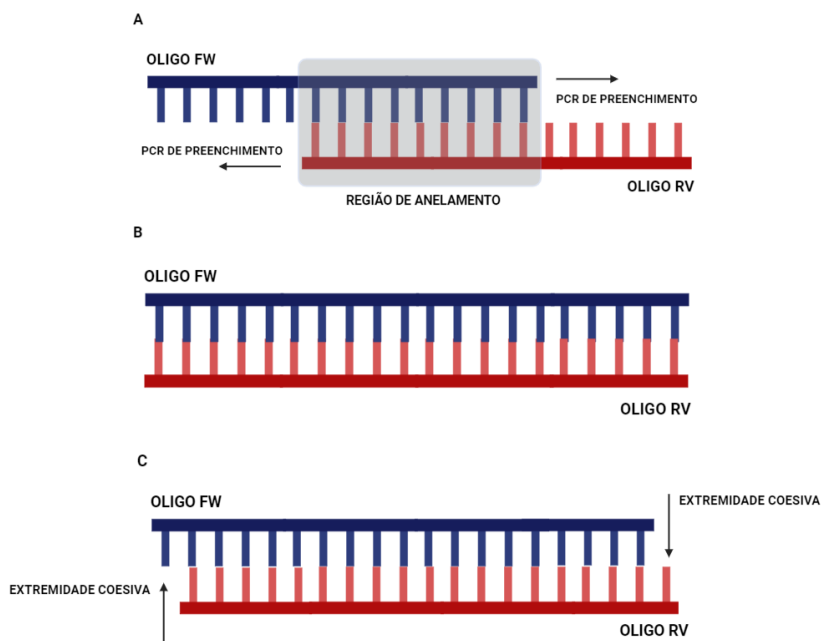
3.1.2.1. Pveg-tetO

Os promotores foram construídos de modos distintos. O Pveg-*tetO* já estava disponível no plasmídeo pBS3Clux na Coleção de Culturas do Laboratório. Bastou apenas extrair o plasmídeo a partir de uma cultura de *E. coli* JM109 recA⁺, utilizando protocolo comercial (Anexo) e transformá-lo em *B. subtilis* (mais adiante).

3.1.2.2. Pveg-cre

Já o promotor Pveg-*cre* foi construído de modo distinto. Foram desenhados dois oligos (ver Tabela 2) com complementariedade parcial e com sítios de restrição BioBrick em suas extremidades de modo que: 1) eles fossem passíveis de anelamento como na Figura 4-A, abaixo. Os dois oligos anelados tiveram suas extremidades preenchidas via PCR de preenchimento (Anexo 2) (Figura 4-B); 2) e foram digeridos com as enzimas *Xba*I e *Pst*II, gerando extremidades coesivas (Figura 4-C) aos plasmídeos pBS3Clux, digerido com as enzimas *Xba*I e *Pst*II; e pSB1C3_TetR (BBa_P0440), digerido com as enzimas *Eco*RI e *Bcu*I, aos quais foram ligados entre os sítios de restrição BioBrick, gerando, assim, as construções pBS3Clux_Pveg-*cre* e pSB1C3_Pveg-*cre*_TetR. A Figura 5, apresenta a esquematização dos promotores.

Figura 4 - Montagem do promotor Pveg-cre utilizando oligos anelados. A: Anelamento e PCR de preenchimento. B: Inseto anelado e preenchido. C: Digestão e geração de extremidades coesivas.

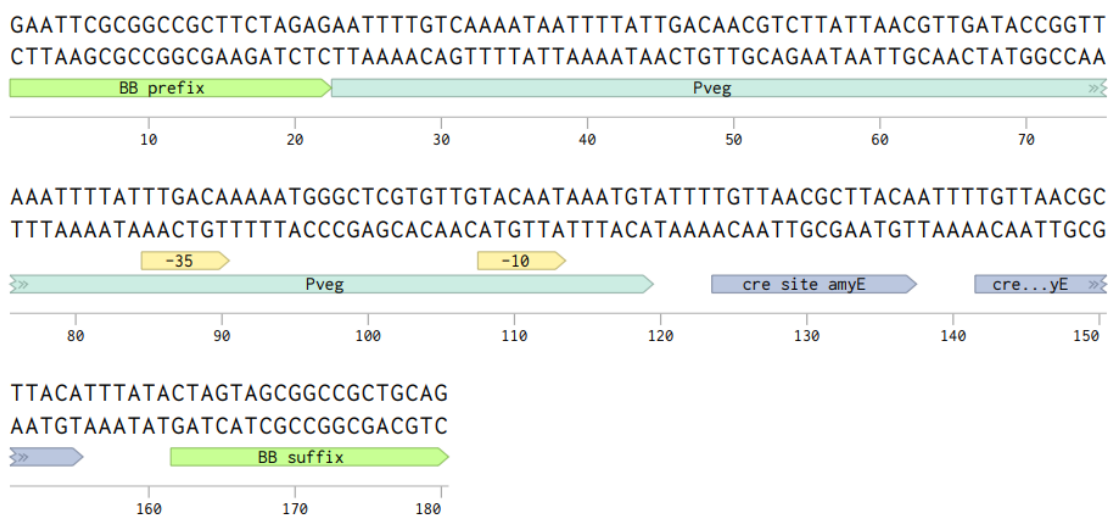


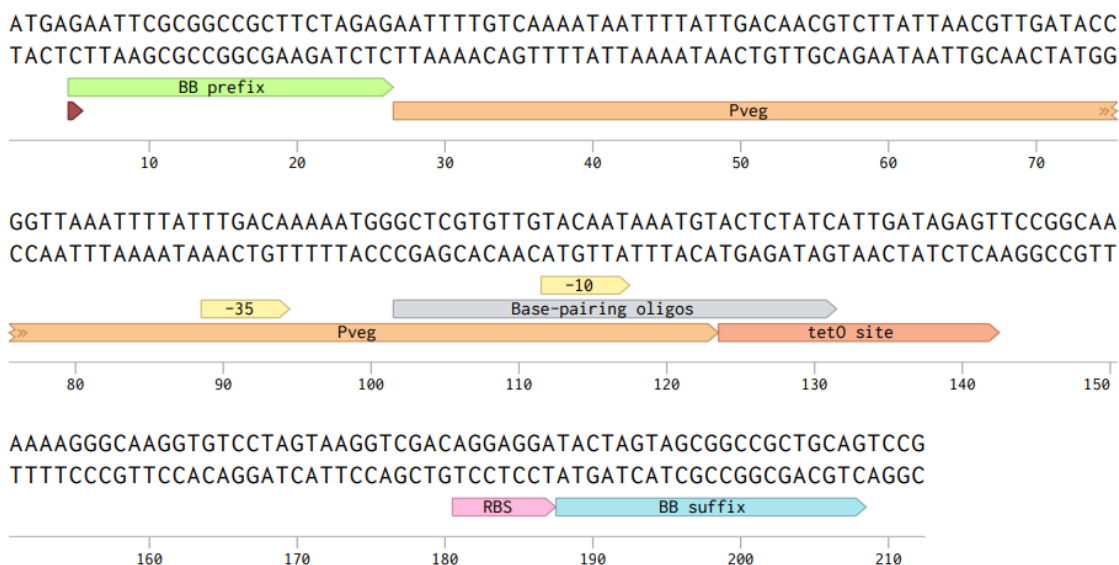
Montagem do promotor Pveg-cre a partir do anelamento de oligos complementares e o preenchimento das extremidades via PCR. O inserto gerado foi digerido com *EcoRI* e *SpeI* gerando extremidades coesivas.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Representação dos promotores construídos. **A:** Pveg-cre. **B:** Pveg-tetO

A



B

A: Promotor Pveg-*cre*, contendo sítios de restrição BioBrick, promotor constitutivo Pveg, dois sítios *cre*, e regiões -10 e -35 do promotor destacadas. **B:** Promotor Pveg-*tetO* contendo dois sítios de restrição BioBrick, promotor constitutivo Pveg, sítio *tetO* e regiões -10 e -35 do promotor destacadas, além de sítio RBS corrigido (tópico 5).

Fonte: Próprio autor.

Tabela 2 - Oligos utilizados para montagem do promotor Pveg-*cre*.

Oligo	Sequência 5' - 3'	Tm °C
Pveg- <i>cre</i> (amyE) forward	AGTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGAATTTGTCAAATAATTTT ATTGACAACGTCTTATTAACGTTGATACCGGTTAAATTTTATTGAC AAAAATGGGCTCGTGTGTAC	67,8
Pveg- <i>cre</i> (amyE) reverse	ATATCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATAAATGTAAGCGTTAACAAA ATTGTAAGCGTTAACAAAATACATTTATTGTACAACACGAGCCCAT TTTTGTCAAATAAAATTTAACC	67,8

Fonte: Próprio autor

3.1.3. Linhagens e Plasmídeos

Para clonagem dos promotores foram utilizados os plasmídeos descritos na Tabela 3, abaixo. Os mapas desses plasmídeos estão disponíveis no Apêndice 2 - Mapas de plasmídeos. Eles foram clonados em linhagens de *E. coli* Top10 quimicamente competentes. Foram extraídos utilizando protocolo comercial e

digeridos com enzimas de restrição para clonagem dos promotores. Foram, então, clonados em *E. coli* Top10. Após confirmação primária via extração plasmidial, e PCR, foram usados para transformar *B. subtilis* 168. Uma etapa posterior de confirmação via sequenciamento foi realizada (Para todos os protocolos ver ANEXO).

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados nesta etapa. a) RADECK et al., 2013; b) Registry of Standard Biological Parts (iGEM Foundation).

Plasmídeo	Descrição	Referência
pBS3Clux	Shuttle-vector para integração no locus <i>sacA</i> de <i>B. subtilis</i> contendo o operon <i>luxABCDE</i> para produção de bioluminescência. A marca de seleção é a resistência à ampicilina para <i>E. coli</i> e cloranfenicol para <i>B. subtilis</i> .	a
BBa_P0440	Plasmídeo pSB1C3 contendo a parte BBa_P0440, formada por um RBS forte (B0034), o gene da TetR-LVA e um terminador duplo com resistência ao cloranfenicol como marca de seleção.	b

Fonte: Próprio autor.

3.1.4. Transformação das linhagens em *E. coli* e *B. subtilis*

Os plasmídeos contendo os promotores foram inicialmente usados para transformar *E. coli* Top10 como forma de gerar uma biblioteca segura das construções. Para isso foi utilizado o protocolo de choque-térmico (HANAHAHAN et al., 1983; INOUE et al., 1990; CHAN et al., 2013). As transformações foram plaqueadas em LB ágar com o antibiótico respectivo para cada plasmídeo, e incubadas a 37°C por 14h a 18h. Uma vez que a biblioteca de promotores foi concluída, ela foi transferida para o chassi definitivo em *B. subtilis*. Os plasmídeos foram extraídos de *E. coli* e usados para transformar *B. subtilis*, utilizando o protocolo de três etapas que faz uso da competência natural da linhagem (BRON et al., 1999), em meio LB ágar com antibiótico adequado, tendo como condições temperatura de 37°C e tempo de incubação de 14h a 18h.

Os clones positivos em cada caso foram estocados em freezer a -80°C em solução de 20% de glicerol (v/v) (SHANNON; MACY, 1973; BAUST et al., 2017).

3.1.5. Resumo das linhagens usadas e construídas na etapa de montagem dos promotores

As linhagens usadas e obtidas como resultado dessas atividades, bem como as enzimas utilizadas na construção de cada uma delas foram organizadas na Tabela 4, de modo que a visualização seja facilitada.

Tabela 4 - Construções geradas na etapa de Montagem dos promotores.

Categoria	Construção	Tipo	Enzimas	Chassi	Resultado
Disponíveis	pSB1C3_TetR (BBa_P0440)	Plasmídeo	<i>EcoRI</i> e <i>BclI</i>	<i>E. coli</i> Top10	/
	pBS3Clux	Plasmídeo	<i>XbaI</i> , <i>PstI</i> e FastAP	<i>E. coli</i> Top10	/
	pBS3Clux_Pveg-tetO	Plasmídeo		<i>E. coli</i> Top10	/
Construídos	Pveg-cre	Inserto	<i>XbaI</i> e <i>PstI</i>	-	/
	pSB1C3_Pveg-cre_TetR	Plasmídeo	-	<i>E. coli</i> Top10	/
	pBS3Clux_Pveg-cre	Plasmídeo	-	<i>E. coli</i> Top10	/
	pBS3Clux_Pveg-cre	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis::Pveg-cre-lux</i>
	pBS3Clux_Pveg-tetO	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis::Pveg-tetO</i>

(-) construções não passaram por reações de digestão pois, ou estavam no formato desejado, ou são resultado de ligação entre plasmídeo e inserto.

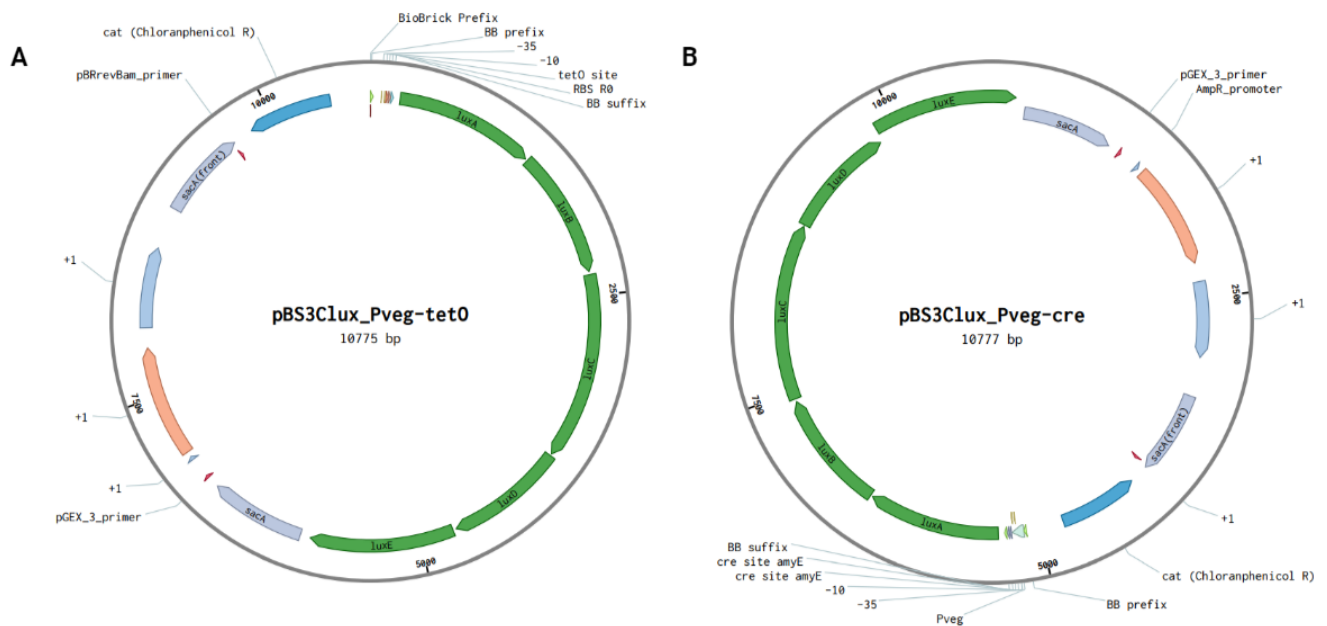
(/) construções não são relevantes para testes de funcionalidade dessa etapa.

Fonte: Próprio autor

As linhagens construídas nessa etapa foram denominadas de *B. subtilis::Pveg-cre-lux*, contém o operon *luxABCDE* sob controle do promotor constitutivo *Pveg-cre*, o qual possui dois sítios *cre*, o que o torna responsivo ao sistema catabólico de carbono; e *B. subtilis::Pveg-tetO*, que contém o operon *luxABCDE* sob controle do promotor *Pveg-tetO*. Ambas as linhagens foram

construídas a partir de *B. subtilis* 168 pela integração das sequências ao locus genômico *sacA*. Os mapas dos plasmídeos usados nessa etapa são mostrados na Figura 6.

Figura 6 - Mapa dos plasmídeos gerados na etapa de montagem dos promotores. A: pBS3Clux_Pveg-cre; B: pBS3Clux_Pveg-tetO.



Mapa dos plasmídeos usados. **A:** contém promotor Pveg-*tetO* controlando o operon *luxABCDE*, marca de seleção baseado na resistência à cloranfenicol, locus *sacA* de integração ao cromossomo em *B. subtilis* e sítios de restrição BioBrick. **B:** mesma estrutura, com a diferença do promotor, nesse caso Pveg-*cre*. **Fonte:** Próprio autor. Imagem gerada no Benchling.

Fonte: Próprio autor.

Nesse ponto cabe uma observação referente a construção pSB1C3_Pveg-*cre* elaborada na etapa de montagem dos promotores. Ela será útil na etapa de construção do circuito. Nesse instante, ela não foi tratada como resultado essencial devido à presença do gene de codificação da proteína TetR que atuará como repressor do sinal de luminescência na ausência de glicose no chamado circuito completo. Como o objetivo inicial é antes testar a funcionalidade dos promotores construídos, a análise dessa construção ficará para a parte 2.

3.1.6. Sequenciamento

As construções foram sequenciadas através do método de Sanger (SANGER et al., 1977), no equipamento ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems. O protocolo de sequenciamento se encontra em Anexo. Os resultados do sequenciamento foram analisados nos softwares Sequence Scanner v 2.0 (Applied Biosystems) e Benchling.

3.1.7. Teste de funcionalidade - Luminescência

A funcionalidade das construções foi testada através da emissão de luminescência decorrente da existência do operon *lux*. A leitura foi realizada em uma leitora de placas da marca TECAN®, modelo Infinite M200 Pro. O protocolo de leitura de luminescência envolveu tempo de integração de 1000 milissegundos (ms) e o método foi composto por 60 a 80 ciclos de 10 minutos totalizando de 12h a 14h de cultivo, com agitação de 180 rpm (aproximadamente uma amplitude de 4 mm). A placa utilizada era da marca Costar®, da cor branca, com 96 poços de fundo reto para leituras envolvendo apenas bioluminescência e de fundo transparente para bioluminescência e densidade óptica concomitantes. Manteve-se essas definições para todas as Partes.

3.1.8. Cultivos

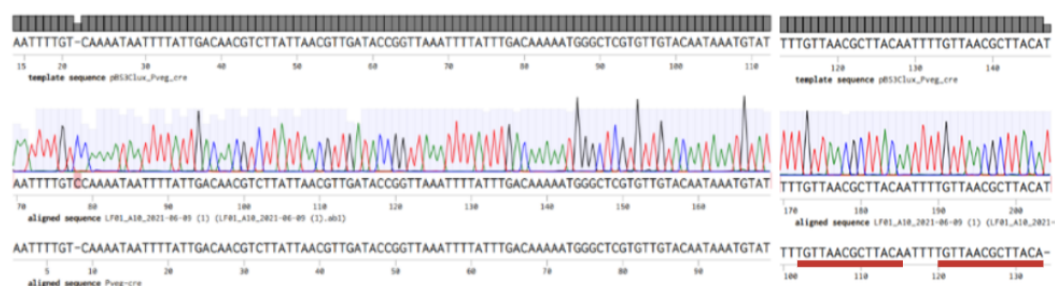
Os cultivos realizados na leitora foram feitos em triplicata para cada fonte de carbono e para cada linhagem. As leituras de densidade óptica a 600nm e luminescência foram tomadas a cada 10 minutos em modo cinética, com duração total de 12h a 16h. Os resultados obtidos foram então tratados através do cálculo de média aritmética padrão para o resultado de cada unidade de tempo e de cálculo de desvio padrão para cada uma das triplicatas. Definições mantidas para todas as Partes.

3.2. Resultados Parte 1 - Montagem dos Promotores

Os resultados da primeira etapa deste trabalho foram voltados para validação da funcionalidade dos promotores construídos. Como é de conhecimento, parte dos experimentos realizados são devidos à erros em um projeto anterior (RIBEIRO, N. V., 2020), no qual o promotor Pveg-*cre* foi incorretamente construído, apresentando uma mutação no sítio *cre* que impactou seu correto funcionamento.

A resolução desse problema foi parte importante deste trabalho, sendo necessária a reconstrução total do promotor em questão. Esse objetivo, bem como a construção do promotor Pveg-*tetO* foram atingidos com sucesso e os resultados detalhados podem ser visualizados a seguir. A seguir, a Figura 7, mostra o sequenciamento referente à correção dos sítios *cre*.

Figura 7 - Resultado do sequenciamento do promotor Pveg-*cre*.



Sequenciamento do promotor Pveg-*cre*. Em vermelho estão assinalados os dois sítios *cre* que tiveram suas sequências corrigidas. Para cada base correta do sequenciamento com o molde há uma marcação em cinza indicando a compatibilidade. O grau de confiabilidade do resultado é dado pelos picos coloridos. Quanto mais agudo, maior a confiabilidade da base sequenciada.

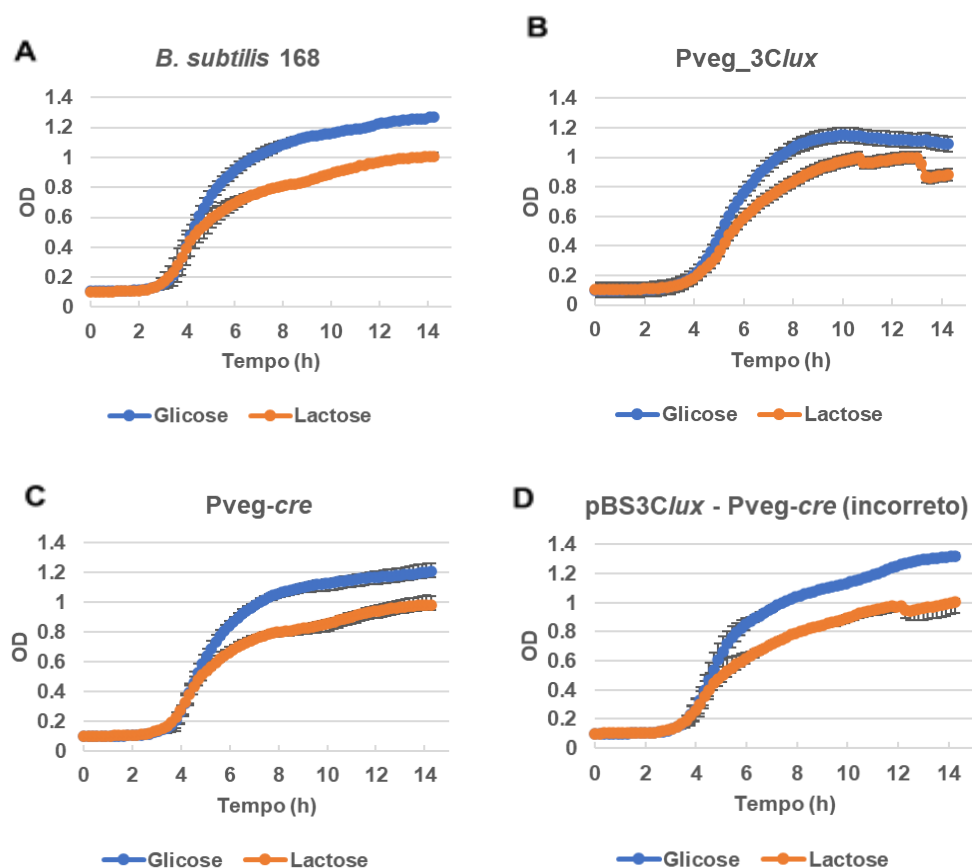
Fonte: Próprio autor.

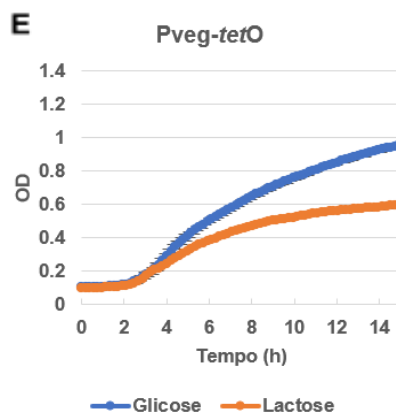
Para comparação dos resultados foram utilizadas duas linhagens já disponíveis no laboratório: a Pveg_3*Clux*, contendo o operon *luxABCDE* sob controle do promotor constitutivo Pveg em *B. subtilis* 168. Essa linhagem deveria, em decorrência da construção mencionada emitir luminescência constitutivamente, servindo como um controle comparativo desta emissão para os promotores. A outra linhagem: Pveg-*cre* (incorreto) construído por Ribeiro (2020) e que apresenta a

mutação no sítio *cre* que reduz a atividade do promotor. Os mapas destes plasmídeos podem ser vistos no Apêndice 2.

Para análise de funcionalidade foram escolhidas duas fontes de carbono, glicose e lactose. Uma delas, a glicose, responsiva ao sistema RCC. Já a lactose, é uma fonte que não responde adequadamente a essa ferramenta de controle metabólico, sendo elas, portanto, ideais para avaliação da funcionalidade destes promotores. Abaixo, nas figuras 8 e 9, esses resultados podem ser visualizados.

Figura 8 - Curvas de crescimento para as diferentes linhagens de *B. subtilis* modificadas com os promotores construídos.





A: Comparação das curvas de crescimento para *B. subtilis* sem modificações em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **B:** Comparação das curvas de crescimento para *B. subtilis* contendo o plasmídeo Pveg_3C*lux* em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **C:** Comparação das curvas de crescimento para *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3C*lux*_Pveg-*cre* incorreto em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **D:** Comparação das curvas de crescimento para *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3C*lux*_Pveg-*cre* em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **E:** Comparação das curvas de crescimento para *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3C*lux*_Pveg-*tetO* em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose.

Fonte: Próprio autor.

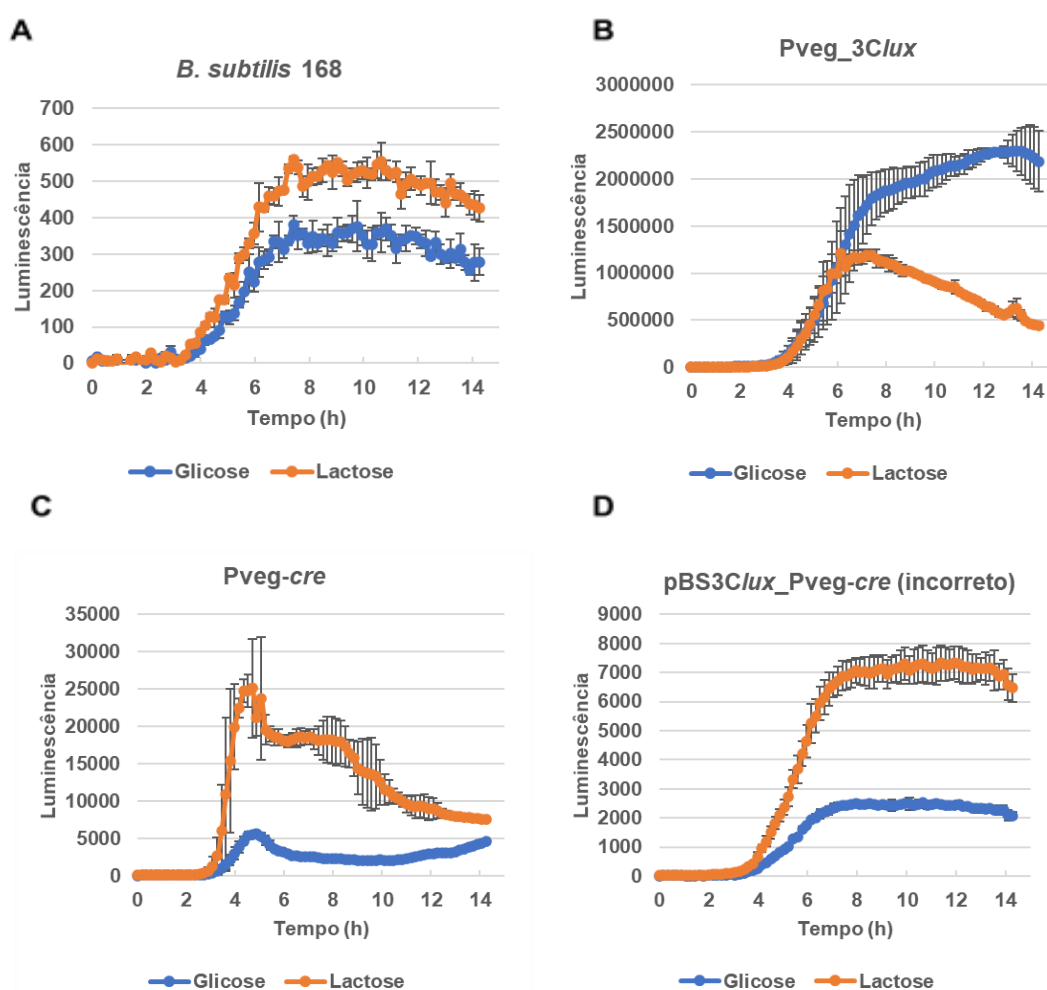
Algumas análises preliminares podem ser tiradas desses resultados de crescimento celular. A primeira delas é referente à diferença de crescimento observada entre a glicose e a lactose para as mesmas condições de crescimento. É de fácil visualização a diferença de densidade celular (OD - optical density) entre as fontes, variando entre aproximadamente 20% até 66% de diferença observada. Isso é uma representação visual da preferência seletiva de *B. subtilis* pela glicose como fonte de carbono em oposição à lactose. Não somente isso, por se tratar de um dímero formado por uma molécula de glicose e outra de galactose, a lactose necessita ser hidrolisada antes pela enzima lactase para ser assimilada, o que faz com que o crescimento a partir dessa fonte seja retardado.

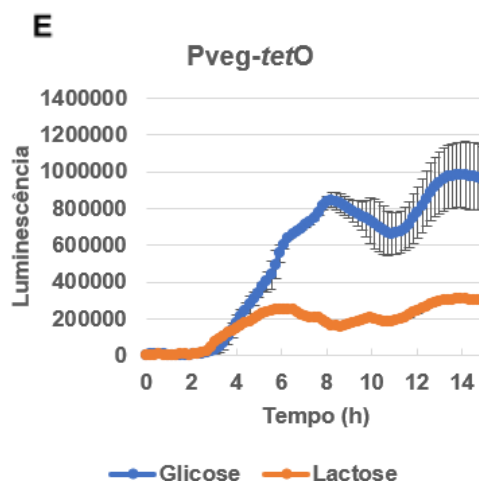
No entanto, é curioso notar que essa diferença começa a ser observada apenas após metade da fase exponencial ter decorrido, o que nesse experimento é observado por volta das quatro horas e meia de cultivo. Antes disso, ambas as fontes apresentam resultados equivalentes, tendo a glicose assumindo vantagem apenas após esse período.

Para os fins deste estudo, esse resultado é suficiente e confiável, pois como será observado a seguir, na Figura 8, os picos de luminescência correspondem ao momento de equivalência de densidade celular entre as fontes, permitindo uma comparação eficiente, muito embora, um ajuste, para levar em consideração as diferenças de densidade celular, tenha sido realizado no formato Luminescência/OD.

A análise dos resultados de luminescência desses cultivos mostrou resultados muito positivos. Em primeiro lugar, foi possível notar que o promotor *Pveg-cre* foi efetivamente corrigido quanto à sua mutação anterior. Além disso, tanto o promotor *Pveg-cre*, quanto o *Pveg-tetO* mostraram-se funcionais e sensíveis ao sistema de RCC. Abaixo nas Figuras 9 e 10, os resultados estão graficamente representados em escalas distintas pois cada um deles representa uma construção diferente, com graus de emissão distintos.

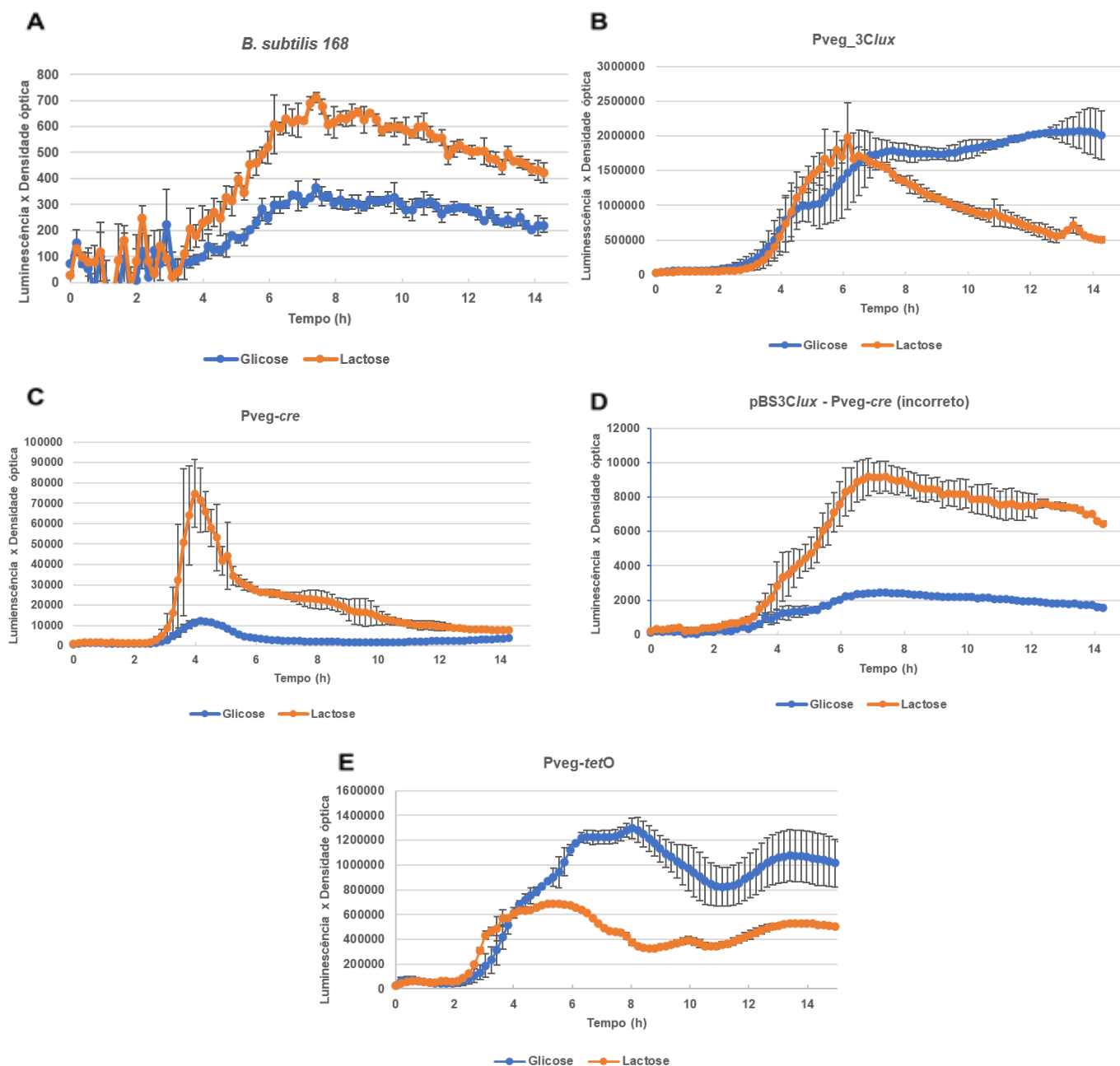
Figura 9 - Emissão de luminescência para os promotores construídos.





Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* sem modificações em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **B:** Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* contendo o plasmídeo Pveg_3Clux em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **C:** Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3Clux_Pveg-cre incorreto em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **D:** Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3Clux_Pveg-cre em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **E:** Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3Clux_Pveg-tetO em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose.

Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Luminescência/Densidade celular para análise dos promotores.

A representação gráfica destaca o ajuste Luminescência/OD, onde a luminescência é dividida igualmente pela densidade celular total de cada amostra. **A:** Representação da escala de Luminescência/OD para a linhagem *B. subtilis* sem modificação. **B:** Representação da escala de Luminescência/OD para a linhagem *B. subtilis* contendo o plasmídeo Pveg_3Clux. **C:** Representação da escala de Luminescência/OD para a linhagem *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3Clux_Pveg-cre. **D:** Representação da escala de Luminescência/OD para a linhagem *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3Clux_Pveg-cre incorreto. **E:** Representação da escala de Luminescência/OD para a linhagem *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3Clux_Pveg-tetO. Importante observar que foram usadas escalas diferentes para cada gráfico.

Fonte: Próprio autor

Como é possível observar, o promotor Pveg-cre comportou-se exatamente como o esperado. Por possuir em sua estrutura dois sítios *cre* associados ao sistema RCC, esse promotor na presença de glicose, fonte preferencial de *B. subtilis*, tem a sua atividade inibida. Recapitulando o mecanismo RCC, explicado no capítulo de desenvolvimento, na presença de glicose, a formação do complexo proteico CcpA-HPr (Ser 46) pela fosforilação da proteína HPr por uma molécula de ATP. Esse complexo interage com os sítios *cre* do promotor, impedindo a transcrição do gene sob controle do promotor em questão.

Nesse cenário, para o promotor Pveg-cre, era esperado uma emissão de luminescência menor para a glicose do que para a lactose, uma vez que a glicose, fonte de carbono preferencial e associada ao RCC impactaria a transcrição, enquanto a lactose, não preferencial e não associada ao RCC, teria uma emissão de luminescência superior. A esse efeito, damos o nome de inversão de sinal.

Na construção homóloga incorreta herdada do projeto anterior, é observado que isso até ocorre, porém em uma magnitude muito inferior à desejada, tanto em escala de emissão, quanto à diferença dessa magnitude entre as fontes. A emissão induzida para lactose é apenas cerca de 2,8 vezes maior do que a observada para glicose. Esse resultado pífio é decorrente justamente da mutação dos sítios *cre*. A correção realizada por meio da reconstrução do promotor Pveg-cre foi eficiente em eliminar essa mutação e promover um aumento substancial da sensibilidade de resposta desse promotor.

No resultado exposto para a correção do promotor Pveg-cre, pode-se notar não só uma magnitude maior de emissão de luminescência, como a diferença da indução da lactose para a glicose é de aproximadamente 5 vezes na média; e de 6,4 vezes no ponto de desvio superior em seu pico. Quando se leva em consideração a Luminescência/OD, a diferença atinge cerca de 7,5 vezes no pico e até 9 vezes no ponto superior. Isso destaca o elevado grau de sensibilidade da resposta desse promotor ao sistema RCC. Além disso, quando comparada à construção Pveg_3C/lux, onde há ausência dos sítios *cre* no promotor Pveg, é nítida a robustez dessa resposta, uma vez que a luminescência emitida na presença de glicose é de magnitude próxima a $2,5 \times 10^6$, enquanto a emissão induzida pela glicose na presença dos dois sítios *cre* é de magnitude $5,0 \times 10^3$. Ou seja, trata-se de uma diferença de aproximadamente 500 vezes.

Uma análise específica para o resultado da lactose também é válida, uma vez que a indução observada para ela na linhagem do promotor Pveg-*cre* é de magnitude aproximada de $2,5 \times 10^4$, muito inferior à observada para lactose na linhagem contendo o promotor Pveg sem os sítios *cre* (Pveg_3C*lux*), mesmo ela não sendo uma fonte de carbono associada ao sistema RCC. Isso é explicado simplesmente pela presença dos sítios *cre* na construção, o qual nunca está completamente liberado, portanto, sempre apresentará algum grau de repressão da expressão do operon *lux* associado ao sistema RCC. pelo fato de a lactose ser hidrolisada ao longo do cultivo para consumo pelo *B. subtilis*. Por fim, tratando do promotor Pveg-*tetO*, outro resultado positivo foi aqui obtido. Nessa situação, como explicado no capítulo de materiais e métodos, o sítio operador *tetO* foi adicionado à estrutura do promotor Pveg. Como os resultados deixam claro, o promotor Pveg-*tetO* possui resposta robusta em magnitude, e sensível às diferentes fontes de carbono empregadas. Trata-se, portanto, de mais um promotor com construção eficientemente alcançada.

Como análises adicionais dos resultados, fica exposto o resultado do metabolismo basal de emissão de luminescência por *B. subtilis* 168 não modificado e a associação à emissão de luminescência à fase log de crescimento celular, tendo a emissão caído drasticamente ou estacionado para todos os promotores após o início da fase estacionária.

4. Parte 2 – Construção e teste do Circuito genético

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Preparo de células competentes de *B. subtilis* PT7lux

Os plasmídeos construídos foram usados para transformar uma linhagem de *B. subtilis* que já continha o plasmídeo pT73Clux inserido no locus *sacA* do cromossomo. Trata-se do plasmídeo pBS3Clux contendo o operon *lux* sob controle do promotor T7. A construção dessa linhagem foi confirmada via PCR de colônia utilizando os oligos da Tabela 5, com produto resultante de 410 pb. O gel de eletroforese que destaca a clonagem pode ser encontrado no Apêndice 4. Após a etapa ter sido bem sucedida, essa nova linhagem, batizada de *B. subtilis* PT7lux ou simplesmente *Bs* PT7lux foi submetida a protocolo de preparo de células competentes para *B. subtilis* (BRON et al., 1999). O mapa desse plasmídeo pode ser encontrado no Apêndice 2.

Tabela 5 - Oligos usados na PCR de colônia para confirmação da linhagem *Bs* PT7lux.

Oligo	Sequência 5' - 3'	Tm °C
BBprefix_fw	ATGAGAATTCGCGGCCGCTTCTAG	61,3
luxA(seq)_rev)	GCTGTGGGAAGAACAATAGC	55

Fonte: Próprio autor.

4.1.2. Linhagens e Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados nessa etapa estão descritos na Tabela 6. Eles estavam disponíveis em *E. coli* Top10, sendo extraídos via protocolo base de extração plasmidial (Anexo). Todos os plasmídeos derivados destes foram construídos em *E. coli* Top10 pela facilidade de ligação e para manutenção da

biblioteca de construções. Após a confirmação das construções, estes foram usados para transformar *E. coli* JM109 recA⁺ pela maior facilidade observada em transformar *B. subtilis* 168 com um plasmídeo extraído dessa linhagem específica em comparação à Top10. O passo a passo da construção dos circuitos seguintes é descrito com mais detalhe nos tópicos subsequentes.

Tabela 6 - Plasmídeos utilizados na etapa de montagem do circuito. Referências: a) este trabalho; b) RIBEIRO, 2020; c) derivado de RADECK et al., 2013.

Plasmídeo	Descrição	Referência
pSB1C3_Pveg-cre-TetR	Plasmídeo pSB1C3 contendo Pveg-cre(corrigido) + RBS forte (B0034) + TetR-LVA + double terminator com marca de seleção à cloranfenicol	a; c
pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp	Plasmídeo pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO, regulado pela proteína repressora TetR. Possui marca de seleção para ampicilina em <i>E. coli</i> e espectomicina em <i>B. subtilis</i> . Possui sítio de integração no locus <i>thrC</i> em <i>B. subtilis</i> .	b; c
pT73Clux	Plasmídeo pSB3Clux com o operon lux sob controle do promotor T7. Possui marca de seleção para ampicilina em <i>E. coli</i> e cloranfenicol em <i>B. subtilis</i> .	b; c

Fonte: Próprio autor.

4.1.3. Construção do circuito pBS4S_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO_T7RNAp

A construção do circuito completo baseou-se em duas construções, uma delas disponibilizada na Parte 1: pSB1C3_Pveg-cre-TetR e a outra herdada do projeto executado por Ribeiro (2020): pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp. O foco dessa etapa foi utilizar o inserto Pveg-cre-TetR, formado pelo gene da proteína repressora TetR sob controle do promotor Pveg-cre construído na Parte 1 e adicioná-lo ao plasmídeo pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp.

Para isso, foi realizada uma PCR do plasmídeo pSB1C3_Pveg-cre-TetR com os oligos disponibilizados na Tabela 7, de modo a gerar um inserto de 1022 pb correspondente ao inserto Pveg-cre-TetR com extremidades BioBrick coesivas que pudessem ser ligadas ao vetor plasmidial pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp.

Tabela 7 - Oligos utilizados para PCR e geração do inserto Pveg-cre-TetR.

Oligo	Sequência 5' - 3'	Tm °C
BBprefix_fw	ATGAGAATTCGCGGCCGCTTCTAG	61.3
BBsuffix_rv	CGGACTGCAGCGGCCGCTACTAG	66.7

Fonte: Próprio autor.

O produto dessa PCR foi então digerido com enzimas de restrição *EcoRI* e *SpeI*, enquanto o vetor plasmidial pBS4S_Pveg-*tetO*-T7RNAp foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*. Vetor e inserto foram ligados gerando a construção pBS4S_Pveg-*cre*-TetR_Pveg-*tetO*-T7RNAp. Este circuito foi construído em *E. coli* Top10, clonado em *E. coli* J109 recA⁺ e por fim clonado nos chassis de destino, *B. subtilis* 168 e *B. subtilis* PT7*lux*, onde se integrou ao cromossomo no locus *thrC*.

4.1.4. Outros circuitos

A construção pBS4S_Pveg-*tetO*-T7RNAp também foi clonada em *B. subtilis* PT7*lux* utilizando protocolo base de transformação em *B. subtilis*. Além dela e das outras construções mencionadas no tópico anterior, o plasmídeo pT73*Clux* clonado anteriormente em *B. subtilis* para posterior geração de células competentes dessa linhagem também foi foco desta etapa e representou o controle basal dos resultados aqui expostos.

4.1.5. Resumo das linhagens usadas e construídas na etapa de montagem

As linhagens usadas e obtidas como resultado dessas atividades, bem como as enzimas utilizadas na construção de cada uma delas foram organizadas na Tabela 8, de modo que a visualização fosse facilitada.

Tabela 8 - Construções geradas na etapa de Montagem do circuito.

Categoria	Construção	Tipo	Enzimas de Restrição	Chassi	Resultado
Disponíveis	pSB1C3_Pveg-cre_TetR	Plasmídeo		<i>E. coli</i> Top10	Inserto Pveg-cre-TetR
	pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP	Plasmídeo	<i>EcoRI</i> , <i>XbaI</i> e FastAP	<i>E. coli</i> JM109	Vetor plasmidial
	Pveg-cre-TetR	Inserto	<i>EcoRI</i> e <i>SpeI</i>	-	/
	pT73Clux	Plasmídeo		<i>E. coli</i> Top10	/
Construído	pT73C<i>lux</i>	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i> PT7<i>lux</i>
	pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	Plasmídeo	-	<i>E. coli</i> Top10	/
	pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	Plasmídeo	-	<i>E. coli</i> JM109	/
	pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i>::Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP.
	pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> PT7<i>lux</i>	<i>B. subtilis</i>::PT7-lux::Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP
	pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> PT7<i>lux</i>	<i>B. subtilis</i>::PT7-lux::Pveg-tetO-T7RNAP

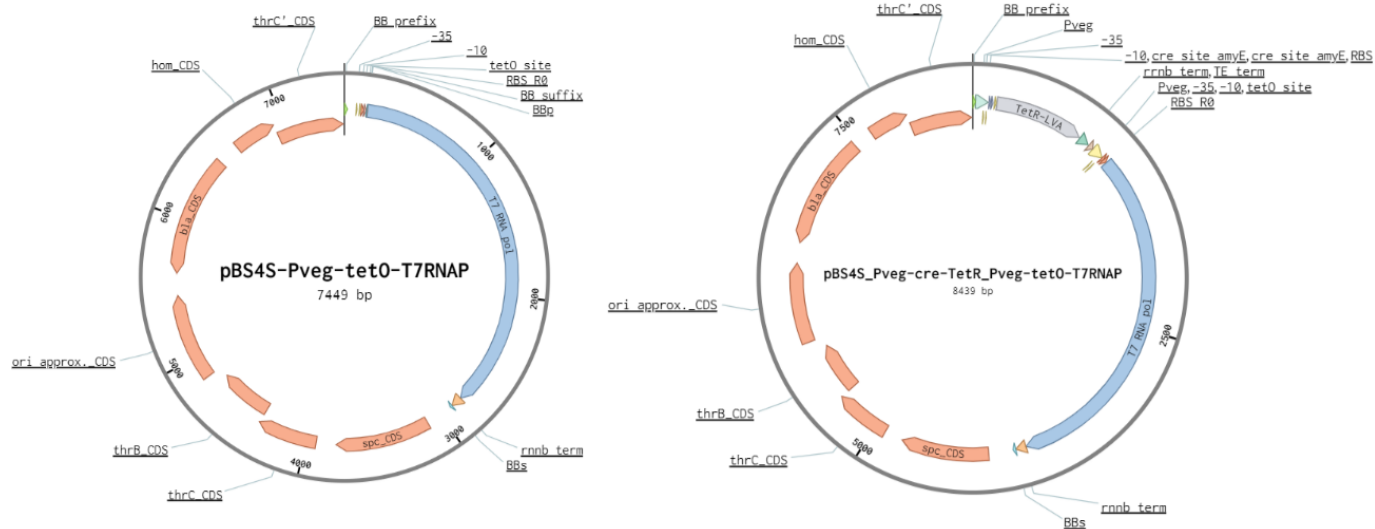
(-) construções não passaram por reações de digestão pois, ou estavam no formato desejado, ou são resultado de ligação entre plasmídeo e inserto.

(/) construções não são relevantes para testes de funcionalidade dessa etapa.

. **Fonte:** Próprio autor.

Abaixo, os mapas dos circuitos pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP e pBS4S_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP estão disponibilizados na Figura 11.

Figura 11 - Mapa dos plasmídeos construídos: **A:** pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP e **B:** pBS4S_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP.



A: Plasmídeo pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO e sítio de integração no *locus thrC*. **B:** pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO, regulado pela proteína repressora TetR, que é controlada por glicose, também contendo sítio de integração no *locus thrC*.

Fonte: Próprio autor.

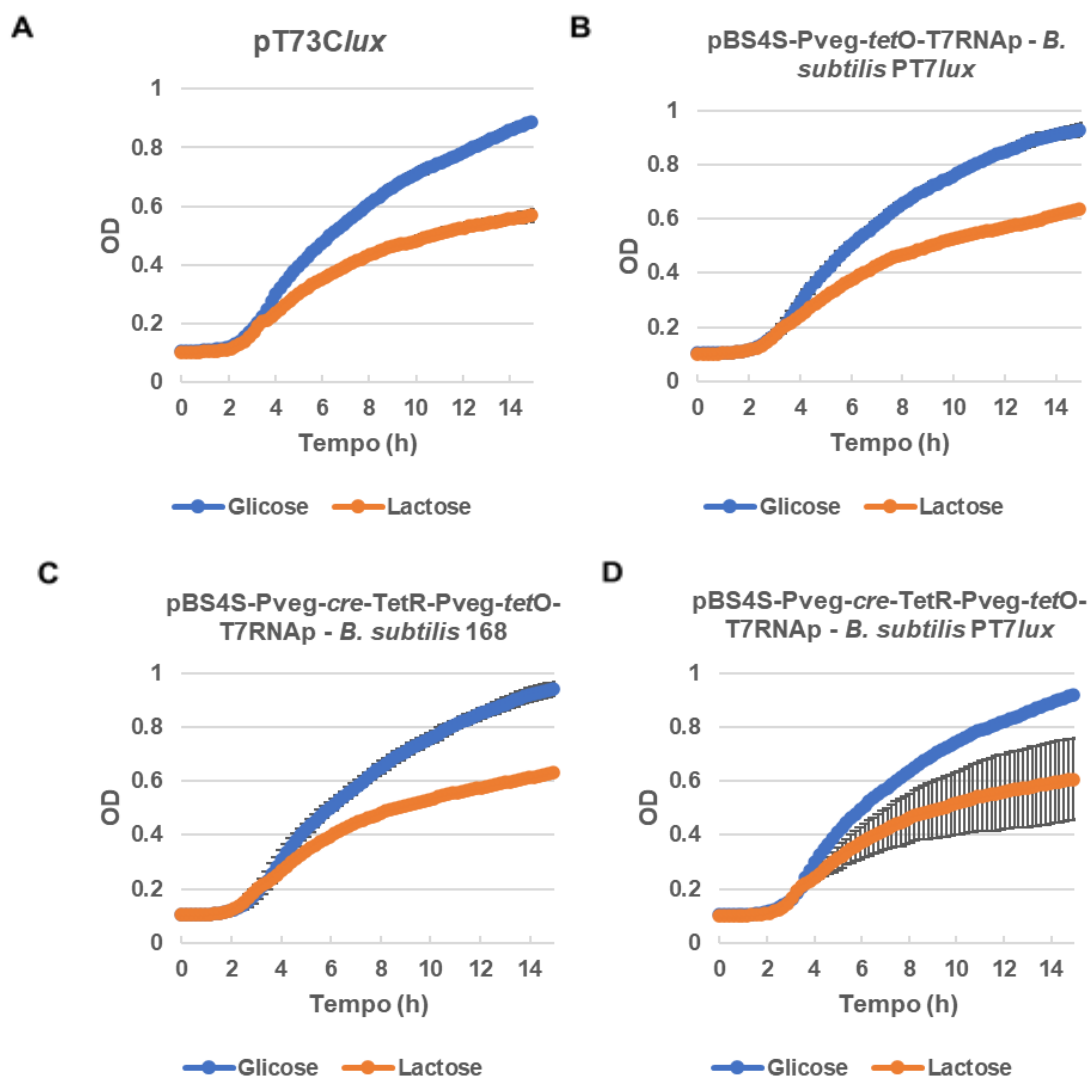
4.2. Resultados Parte 2 - Montagem do Circuito

A expectativa desta segunda rodada de resultados seria confirmar o funcionamento efetivo do biossensor gerado pelo circuito clonado em *B. subtilis* PT7*lux*: pBS4S_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP. Recapitulando, neste circuito tem-se a o gene da proteína repressora TetR sob controle do promotor Pveg-cre, responsivo ao sistema de repressão catabólico de carbono (RCC). Desse modo, na presença de glicose, esse gene não será expresso e a proteína não será sintetizada. O inverso irá ocorrer na ausência de glicose, e portanto, tendo como resultado a produção da proteína.

Assim, quando há altas concentrações de glicose no meio, e a consequente repressão dessa proteína, o promotor Pveg-tetO, que é regulado negativamente pela ação dessa proteína é ativado, permitindo a expressão da T7RNAP, responsável pela ativação do promotor T7 que controla o operon *luxABCDE*, emitindo o sinal resposta via luminescência.

Infelizmente, os resultados expostos abaixo mostraram que o circuito não estava funcional, pois mesmo na presença de glicose, ele não se comportava como esperado, emitindo taxas baixas de luminescência. As figuras 12 e 13, a seguir destacam esses resultados.

Figura 12 - Curvas de crescimento para as diferentes linhagens de *B. subtilis* modificadas com os circuitos construídos.



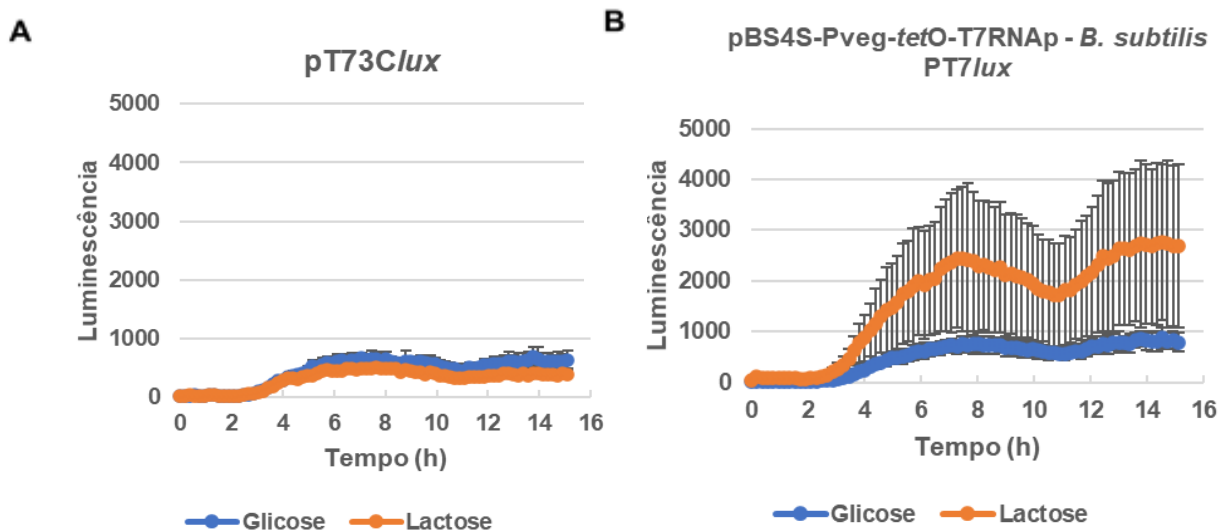
A: Curvas de crescimento para *B. subtilis* 168 contendo o plasmídeo pT73Clux integrado ao cromossomo em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **B:** Curvas de crescimento para *B. subtilis* PT7lux contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **C:** Curvas de crescimento para *B. subtilis* 168 contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-cre-TetR-Pveg-tetO-T7RNAP em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **D:** Curvas de crescimento para *B. subtilis* PT7lux contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-cre-TetR-Pveg-tetO-T7RNAP em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose.

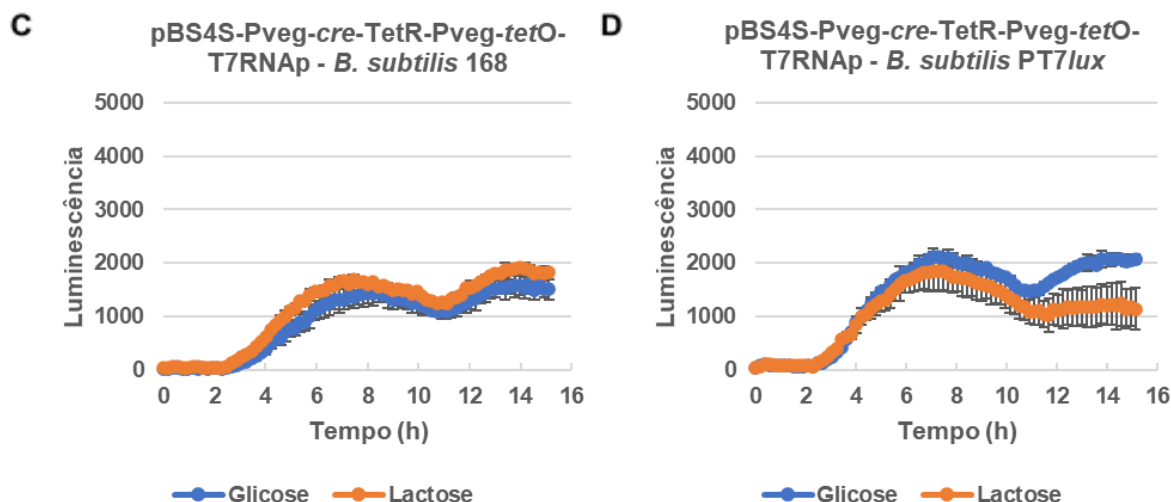
Fonte: Próprio autor.

Como é observado na figura 12, não houve nenhuma diferença substancial quanto ao crescimento celular observado para o biossensor quando comparado aos resultados dos promotores individualizados na Parte 1. Novamente, a glicose como fonte preferencial apresentou crescimento superior à lactose em todas as situações, apresentando ambas equivalências de crescimento por um período mais curto de tempo dessa vez, aproximadamente três horas de cultivo, tendo ao final do cultivo uma diferença aproximada de 50% entre elas.

O grande problema desta etapa, como mencionado, fica a cargo dos resultados de emissão de luminescência retratados na figura 13.

Figura 13 - Emissão de luminescência para o biossensor e seus respectivos controles.





Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* contendo o plasmídeo pT73C/lux integrado ao cromossomo em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **B**: Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* PT7lux contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **C**: Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* 168 contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-cre-TetR-Pveg-tetO-T7RNAp em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose. **D**: Comparação das curvas de luminescência para *B. subtilis* PT7lux contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-cre-TetR-Pveg-tetO-T7RNAp em meio LB com 1% de glicose e 1% de lactose.

Fonte: Próprio autor.

Fica claro pelos resultados gráficos que o biossensor não estava funcional. A emissão de luminescência gerada foi muito baixa e aquém até mesmo do mínimo esperado. Além do biossensor, o circuito pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp que deveria comportar-se como emissor de luminescência contínua, isto é, sem a presença da regulação via RCC não se comportou como esperado do mesmo modo.

Isso suscitou dúvidas a cerca do que poderia ter ocorrido com os circuitos, uma vez que os promotores haviam sido bem caracterizados na Parte 1 e sabia-se que eram funcionais, robustos e sensíveis. Desse modo, problemas nos promotores foram descartados logo no início e o foco mudou-se para a análise de sequências que haviam sido disponibilizadas prontas no início dos experimentos.

5. Parte 3 - Otimizações: Teste RBS/*lux* e Teste de Meios

Após muitas hipóteses terem sido levantadas, descobriu-se que o provável erro causador do mal funcionamento do circuito era a ausência de um sítio RBS entre o promotor Pveg-*tetO* e o gene da T7RNAP do circuito herdado de Ribeiro (2020). Dessa maneira, sem a existência do sítio RBS não haveria como ocorrer a síntese da T7RNAP e consequentemente não haveria ativação do promotor T7 sob o qual o operon *lux* estava submetido.

Desse modo, foi necessário reconstruir o circuito pBS4S_Pveg-*tetO*-T7RNAP de modo a introduzir um sítio RBS entre o promotor e o gene e dessa maneira tentar sanar o problema da expressão.

Após a introdução do RBS, contudo, o problema persistiu. Assim, uma nova rodada de testes teve de ser realizada, dessa vez envolvendo a experimentação de novos meios de cultivo para buscar o pleno funcionamento do circuito biossensor.

Ao final dessas duas rodadas de correção e otimização respectivamente, o circuito biossensor estava finalmente funcional.

5.1. Introdução do sítio RBS/*lux*

Para reconstrução do circuito pBS4S_Pveg-*tetO*-T7RNAP e consequentemente do biossensor pBS4S_Pveg-*cre*-TetR_Pveg-*tetO*-T7RNAP foi necessário sintetizar um sítio RBS, que recebeu a definição de RBS/*lux* em alusão ao problema que ele visava solucionar: a emissão de luminescência do operon *lux*. Esse RBS foi sintetizado no formato de oligos *forward* e *reverse* contendo uma região de homologia (do mesmo modo indicado na Figura X dos Materiais e Métodos do Tópico 3) juntamente com sequência do promotor Pveg-*tetO* contendo extremidades BioBrick prefixo e sufixo.

Esses oligos foram anelados e preenchidos como explicado nos Materiais e Métodos da Parte 1. Em seguida foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*. Ele foi ligado ao plasmídeo pBS4S_T7RNAP digerido com as enzimas *EcoRI*, *XbaI* e FastAP gerando o circuito pBS4S_Pveg-*tetO*-RBS/*lux*-T7RNAP, um equivalente ao pBS4S_Pveg-*tetO*-T7RNAP da Parte 2 com o adicional de ter sido corrigido quanto à ausência do sítio RBS.

5.2. Montagem do biossensor

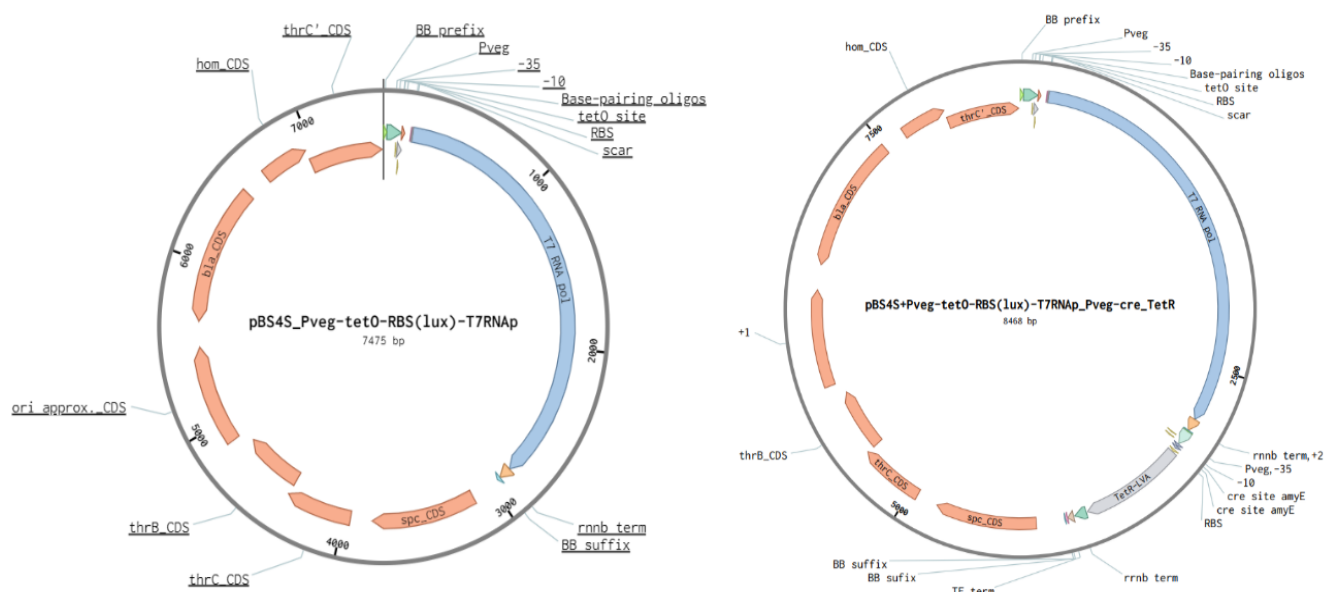
pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP_Pveg-cre-TetR

A última etapa de correção do circuito foi adicionar novamente o inserto Pveg-cre-TetR correspondente à parte associada à regulação metabólica de carbono. Para esse procedimento, foi seguido o mesmo protocolo descrito na Parte 2 - Construção do circuito pBS4S_Pveg-cre_TetR_Pveg-tetO_T7RNAP, com um diferencial. Para evitar o risco de as RNAs polimerases dos promotores Pveg-cre e Pveg-tetO se sobreporem umas às outras e atrapalharem a transcrição do circuito decidiu-se clonar o inserto Pveg-cre-TetR à jusante na sequência, ou seja, após o gene da T7RNAP. Isso representou apenas uma opção estrutural, que em nada impactou no funcionamento do circuito.

Para isso, o inserto foi digerido com as enzimas *XbaI* e *PstI*, enquanto o plasmídeo vetor pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP foi digerido com as enzimas *SpeI*, *PstI* e *FastAP*. Foram ligados e clonados em *E. coli* Top10, *E. coli* JM109 recA+, *B. subtilis* 168 e *B. subtilis* PT7lux. O circuito gerado foi denominado pBS4S_Pveg-tetO-RBSlux-T7RNAP_Pveg-cre-TetR.

Os mapas dos plasmídeos construídos pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP e pBS4S_Pveg-tetO-RBSlux-T7RNAP_Pveg-cre-TetR podem ser vistos na Figura 14, abaixo.

Figura 14 - Mapa dos plasmídeos construídos: A: pBS4S_Pveg-tetO-RBSlux-T7RNAP e B: pBS4S_Pveg-tetO-RBS lux-T7RNA Pveg-cre-TetR.



A: Plasmídeo pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO e sítio de integração no *locus thrC*. Contém RBS*lux*. **B:** pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO, regulado pela proteína repressora TetR, que é controlada por glicose, também contendo sítio de integração no *locus thrC*. Contém RBS*lux*.

Fonte: Próprio autor.

5.3. Resumo das linhagens usadas e construídas na etapa 3 de correção

Abaixo, na Tabela 9, há uma relação das construções e linhagens usadas e geradas nessa etapa do trabalho para facilitar o entendimento e visualização. São as últimas construções feitas e nesse caso limitam-se a correções na sequência do circuito não trazendo nenhum detalhe novo às construções já mostradas no Tópico 4.

Tabela 9 - Construções geradas na etapa de correção do circuito.

Categoria	Construção	Tipo	Enzimas	Chassi	Resultado
Disponíveis	Pveg-cre_TetR	Inserto	<i>XbaI</i> e <i>PstI</i>	<i>E. coli</i> Top10	Inserto Pveg-cre-TetR
	pBS4S_T7RNAp	Plasmídeo	<i>EcoRI</i> , <i>XbaI</i> e FastAP	<i>E. coli</i> JM109	Vetor Plasmídial
Construídos	Pveg-tetO-RBS <i>lux</i>	Inserto	<i>EcoRI</i> e <i>SpeI</i>		Inserto
	pBS4S_Pveg-tetO-RBS <i>lux</i> -T7RNAp	Plasmídeo	-	<i>E. coli</i> JM109	/
	pBS4S_Pveg-tetO-RBS<i>lux</i>-T7RNAp	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> PT7<i>lux</i>	<i>B. subtilis</i> PT7<i>lux</i>::pBS4S_Pveg-tetO-RBS<i>lux</i>-T7RNAp
	pBS4S_Pveg-tetO-RBS <i>lux</i> -T7RNAp_Pveg-cre-TetR	Plasmídeo	-	<i>E. coli</i> JM109	
	pBS4S_Pveg-tetO-RBS<i>lux</i>-T7RNAp_Pveg-cre-TetR	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> PT7<i>lux</i>	<i>B. subtilis</i> PT7<i>lux</i>::pBS4S_Pveg-tetO-RBS<i>lux</i>-T7RNAp_Pveg-cre-TetR
	pBS4S_Pveg-tetO-RBS<i>lux</i>-T7RNAp_Pveg-cre-TetR	Plasmídeo	-	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i>::pBS4S_Pveg-tetO-RBS<i>lux</i>-T7RNAp_Pveg-cre-TetR

(-) construções não passaram por reações de digestão pois, ou estavam no formato desejado, ou são resultado de ligação entre plasmídeo e inserto.

(/) construções não são relevantes para testes de funcionalidade dessa etapa.

Fonte: Próprio autor.

5.4. Teste dos Meios

Como mencionado na introdução desta Parte, a simples correção do circuito não funcionou, sendo necessária a otimização das condições de cultivo para que ele se comportasse como esperado. Para isso, uma série de cultivos foram realizados com dois tipos de meios, LB e Power com concentrações diferentes de glicose e lactose, como mostrado na Tabela 10, abaixo. As condições de cultivo e os testes de funcionalidade em cada um deles são os mesmos descritos nos tópicos Cultivos e Teste de Funcionalidade do Tópico 3 deste trabalho.

Tabela 10 - Composição dos meios usados na etapa de otimização dos meios.

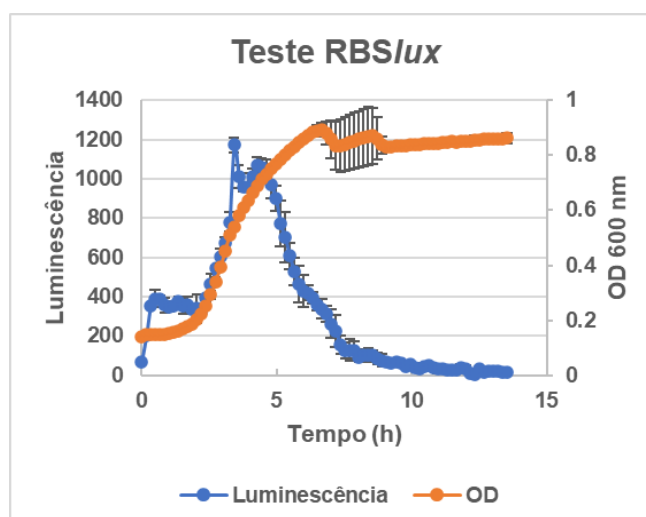
Meio	Açúcar	% (v/v)
LB	-	-
LB	Glicose	3
LB	Lactose	3
Power	Glicose	1
Power	Lactose	1

Fonte: Próprio autor.

5.5. Resultados Parte 3.1 - RBS/lux

Uma vez corrigido o circuito, um novo teste em meio LB suplementado apenas com glicose 1%, dessa vez sem um cultivo paralelo com lactose, foi realizado. O intuito era apenas verificar se o circuito iria emitir luminescência para que novos e mais completos testes fossem realizados. Abaixo, na Figura 15, o resultado desse teste está disponível.

Figura 15 - Teste RBSlux em meio LB + glicose 1%.



Resultado do teste de Luminescência emitida e densidade celular pelo circuito pBS4S_Pveg-tetO-RBSlux-T7RNAp_Pveg-cre-TetR em *B. subtilis* PT7lux em meio LB suplementado com glicose 1%.

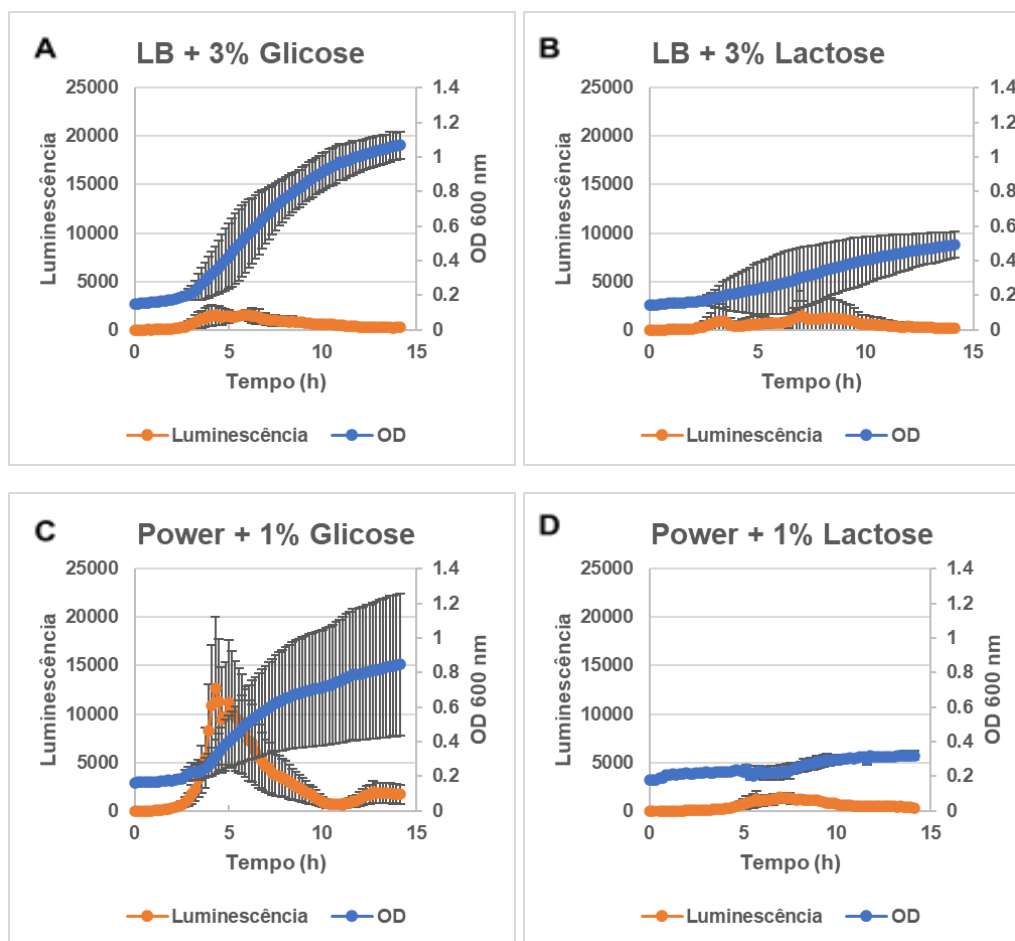
Fonte: Próprio autor.

Como destacado no resultado acima, o circuito novamente não apresentou emissão de luminescência, sendo o resultado ainda mais insatisfatório do que os anteriormente conseguidos. Desse modo, como as possibilidades de erros nos promotores e no circuito como um todo estavam descartadas, foi decidido seguir para uma etapa de otimização do cultivo e dos testes.

5.6. Resultados Parte 3.2 - Teste de Meios

Como etapa de otimização foi decidido analisar o comportamento do circuito em diferentes meios, suplementados com diferentes concentrações de glicose e lactose, como exposto no tópico de Materiais e Métodos do Tópico 4. A seguir, na Figura 16, os resultados dos cultivos.

Figura 16 - Emissão de luminescência e densidade celular para o circuito pBS4S_Pveg-tetO-RBSlux-T7RNAp_Pveg-cre-TetR em *B. subtilis* PT7lux em diferentes meios e concentrações de açúcares.



Resultados para emissão de luminescência e densidade celular para linhagem de *B. subtilis* PT7lux contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp-Pveg-cre-TetR em meio LB suplementado com **A:** 3% de glicose. **B:** 3% de lactose. **C:** 3% de glicose. **D:** % de lactose.

Fonte: Próprio autor.

Os resultados da etapa de otimização do cultivo trouxeram respostas muito positivas e bastante interessantes. O primeiro resultado e o mais importante foi a emissão de luminescência registrada no meio Power suplementado com 1% de glicose. Essa era a resposta desejada desde o início dos testes e foi finalmente atingida nessa configuração. Alta emissão de luminescência na presença de glicose.

Em oposição, os cultivos realizados em LB, independente da fonte, novamente incorreram nos problemas vistos anteriormente relacionados à emissão de luminescência. Mesmo triplicando a concentração de açúcar (de 1% para 3%), isso não impactou a emissão em magnitude, tampouco o crescimento celular, que se manteve nos níveis anteriormente vistos para glicose e lactose.

Destaque para o cultivo em LB não suplementado o qual não registrou crescimento celular, pelo contrário, houve decréscimo em relação a OD inicial. Um aspecto positivo, por outro lado, que pode estar associado ao não crescimento ou ao bom funcionamento do circuito foi a não emissão de luminescência na ausência de fonte de carbono.

Por fim, a última análise quantitativa dos resultados fica para o crescimento celular aquém do esperado para o cultivo em Power suplementado com lactose 1%. O crescimento registrado foi baixo (0.1 para 0.3), o que impacta a avaliação da emissão de luminescência. Ela pode ter sido baixa devido à sensibilidade do circuito do biossensor, o que seria algo muito positivo, ou devido ao não crescimento da bactéria. Esse cultivo foi repetido outras vezes e o mesmo resultado era obtido, desse modo, constatou-se que a composição Power + lactose não é benéfica para o *B. subtilis*.

Assim, os experimentos do Tópico 6 foram voltados para encontrar e analisar o comportamento do circuito em diferentes fontes de carbono de modo a encontrar uma que seja ideal para comparação com a glicose.

Ainda é interessante pontuar que o circuito apenas funcionou em um meio de cultivo rico em nutrientes e fonte de carbono, em oposição ao meio simples LB. Isto pode indicar que a robustez do circuito e o fato de ser constitutivamente regulado provoca uma carga metabólica excessiva sobre o *B. subtilis* onde em condições de falta de nutrientes ele seja obrigado a escolher entre favorecer o crescimento celular ao invés de emitir a luminescência. Essa hipótese, bem como a razão pela qual o *B. subtilis* não se adapta bem ao Power com lactose carecem de mais experimentos para confirmação.

6. Parte 4 - Maximização dos resultados e definição da fonte de carbono ideal

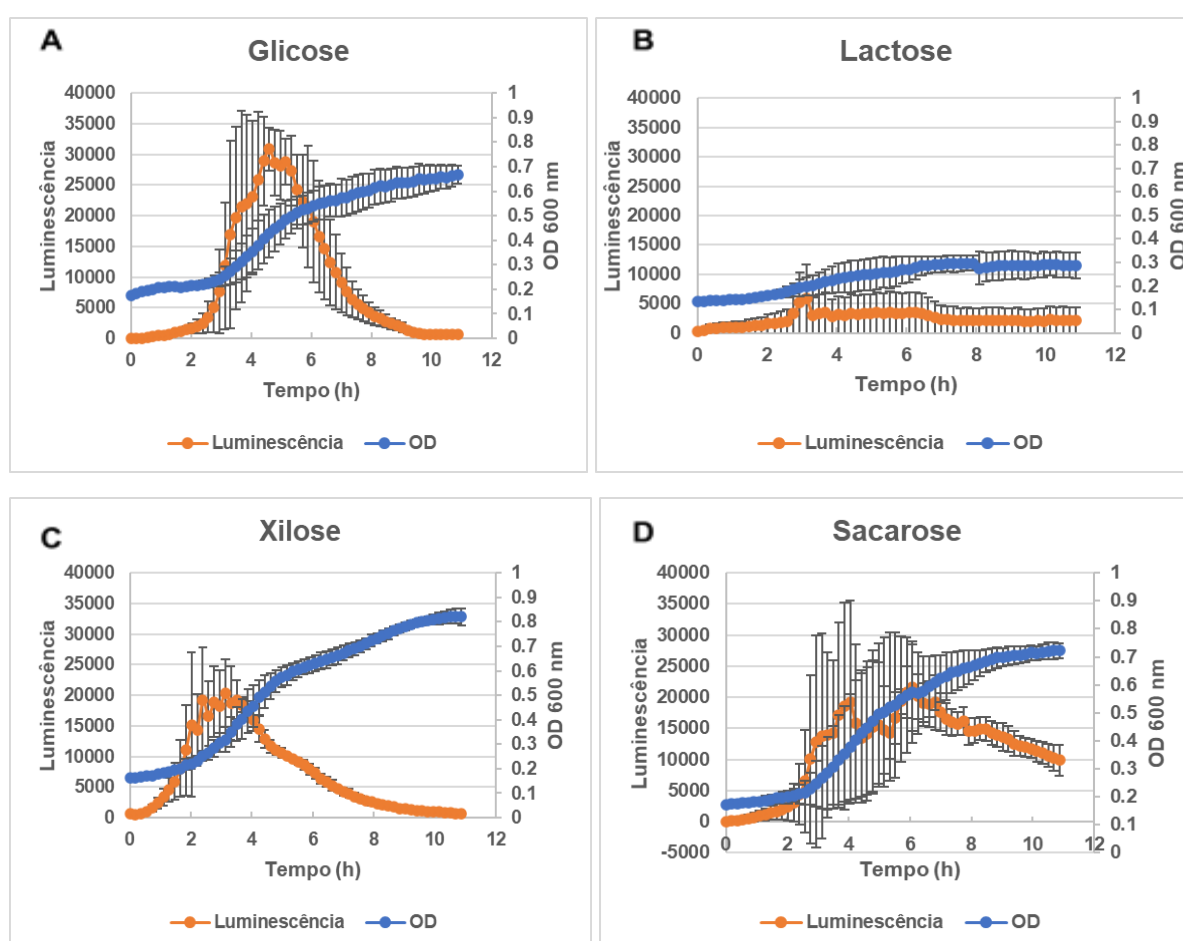
Essa etapa do trabalho voltou-se para a definição da fonte de carbono ideal para comparação com a glicose. Foram testadas, além da glicose, outras cinco fontes: lactose, xilose, sacarose, maltose e glicerol. Os resultados foram obtidos com o circuito biossensor pBS4S_Pveg-tetO-RBSlux-T7RNAp-Pveg-cre-TetR em *B. subtilis* PT7lux. Como será visto nos resultados dessa etapa, os dados foram tratados também no formato Luminescência/Densidade celular para minimizar as

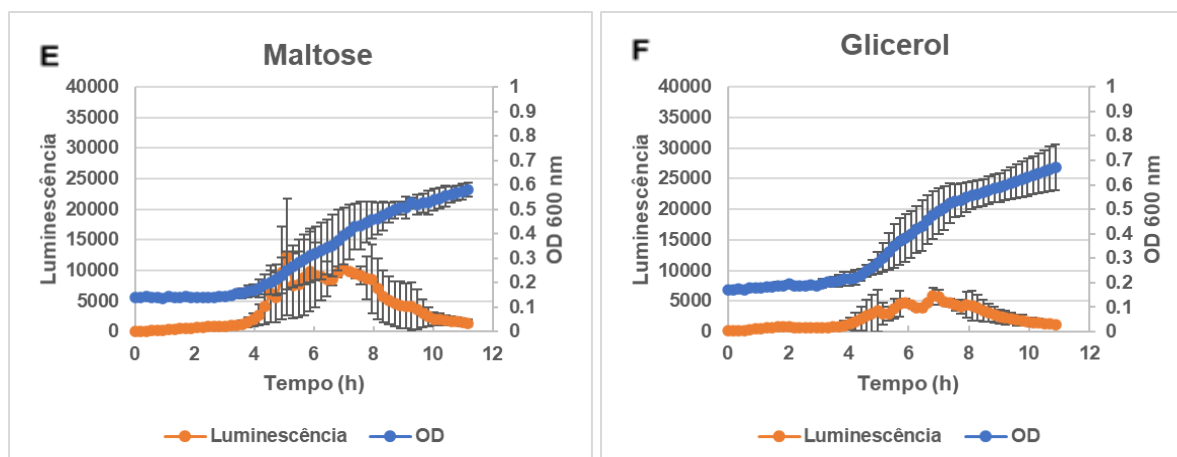
diferenças de intensidade provocadas pelas diferentes concentrações celulares para cada meio e fornecer um resultado mais próximo do ideal.

6.1. Resultados Parte 4 - Definição de fonte de carbono

Os resultados para emissão de luminescência e densidade ótica para as diferentes fontes de carbono, bem como o ajuste para Luminescência/OD podem ser vistos a seguir nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 - Emissão de luminescência do biossensor para diferentes fontes de carbono.





Resultados para emissão de luminescência e densidade celular da linhagem de *B. subtilis* PT7lux contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-*tetO*-T7RNAP-Pveg-*cre*-TetR para diferentes condições de meios de cultivo em meio Power suplementado. **A:** 3% de glicose. **B:** 3% de lactose. **C:** 3% de xilose. **D:** 3% de sacarose. **E:** 3% de maltose. **F:** 3% de glicerol.

Fonte: Próprio autor.

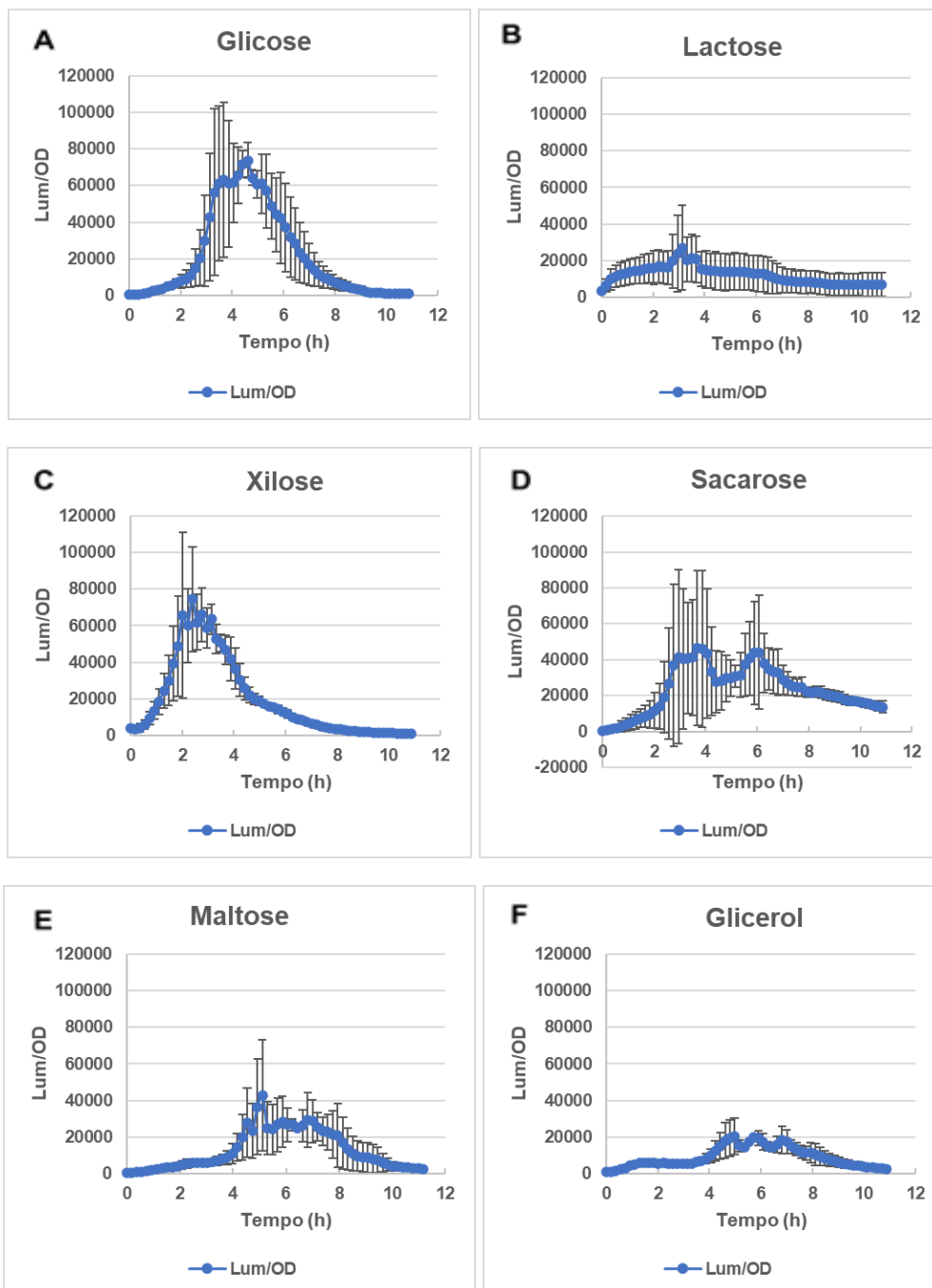
Novamente, como visto nos resultados do tópico de Resultados 3.2, a lactose foi a única fonte a apresentar problemas no crescimento, destacando e confirmando o fato dela não ser a fonte ideal para o crescimento do *B. subtilis*. Para todas as outras fontes, crescimento considerável, embora sempre abaixo do visto para o meio LB foi registrado, com destaque para a densidade celular atingida nos cultivos de xilose e sacarose, ambas superiores à glicose. As densidades registradas para maltose e glicerol foram positivas também, embora um pouco abaixo da observada para a glicose.

Tratando da emissão da luminescência para cada cultivo, a glicose apresentou um resultado muito positivo, atingindo cerca de 30000 ua com desvio superior ultrapassando as 35000 ua. Os cultivos com xilose e sacarose não só acompanharam a glicose na densidade celular, mas na emissão de luminescência também atingiram cerca de 66% do observado para glicose, com picos de 20000 ua para cada uma. Maltose e glicerol comportaram-se como o esperado para lactose, com baixa emissão de luminescência, com destaque especial ao glicerol, que mesmo apresentando alto crescimento celular, emitiu luminescência a taxas próximas à lactose, cerca de 5000 ua.

Por fim, de modo a ter um resultado mais fiel e com reduzido impacto das diferentes densidades celulares, os dados foram tratados para o formato

Luminescência/OD. Esse modelo de resultado dilui as discrepâncias de densidade celular entre as fontes de carbono, de modo a produzir um resultado que forneça a sua de luminescência para cada unidade de densidade celular. Os resultados podem ser observados na Figura 18, abaixo.

Figura 18 - Resultados para diferentes fontes de carbono - Luminescência/OD.



Resultados para emissão de luminescência por densidade celular da linhagem de *B. subtilis* PT7lux contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAp-Pveg-cre-TetR para diferentes condições de

meios de cultivo em meio Power suplementado. **A:** 3% de glicose. **B:** 3% de lactose. **C:** 3% de xilose. **D:** 3% de sacarose. **E:** 3% de maltose. **F:** 3% de glicerol.

Fonte: Próprio autor.

Os resultados acima evidenciam mais uma vez a sensibilidade do circuito biossensor. Os níveis de luminescência por densidade celular atingidos para glicose são muito elevados, atingindo cerca de 80000 ua/OD₆₀₀, com picos do desvio superior atingindo até 100000 ua/OD₆₀₀. Valor não só alcançado, mas superado apenas pelo cultivo de xilose, onde picos de desvio superior atingiram até 110000 ua/OD. Isso destaca um grau de sensibilidade muito elevado para o biossensor na presença de glicose e xilose.

Agora, em relação à maltose e sacarose os resultados foram intermediários, apresentando picos de aproximadamente 40000 ua/OD₆₀₀. Isso pode ser explicado pela estrutura química desses dois açúcares, ambos dímeros de mais difícil metabolização e portanto, portanto com maior tempo de resposta e menor impacto sobre a regulação do circuito. É interessante notar que diferentemente da glicose da xilose que apresentaram um pico único e agudo, tanto a maltose quanto a sacarose apresentaram ao menos dois picos mais agudos acompanhados de uma faixa de estabilidade na luminescência emitida durante um período de aproximadamente três horas antes de declinar. Esse platô pode estar associado ao processo de hidrólise desses dissacarídeos para metabolização e consequente liberação de moléculas de glicose, as quais alimentaram a regulação do biossensor durante mais tempo devido à concentrações mais controladas ao longo do tempo.

Por fim, a análise das curvas de lactose e glicerol trazem duas fontes de carbono não responsivas ao sistema RCC. Como esperado, a emissão de luminescência foi baixa, mesmo após o ajuste realizado. Ambos os resultados mostram a sensibilidade e robustez do biossensor, mostrando alto grau de refinamento na resposta dada a partir das fontes de carbono disponibilizadas. Contudo, para um teste final, explorado no tópico 7, optou-se pela utilização do glicerol, uma vez que sua resposta é muito semelhante à lactose, mas ele apresenta a vantagem de promover um crescimento celular mais acentuado, o que reduz os desvios gerados pelas diferentes densidades celulares, e aumenta a confiabilidade da resposta. Abaixo, por fim, há na Tabela 11, uma comparação da intensidade de

resposta entre os picos médios de cada fonte de carbono em relação à fonte padrão: glicose.

Tabela 11 - Comparação Luminescência/OD - Outras Fontes x Glicose.

Fonte de Carbono	Pico Médio	Glicose/Fonte X
Glicose	73734,38	1,00
Lactose	26983,42	2,73
Xilose	74516,4	0,99
Sacarose	46341,92	1,59
Maltose	42656,38	1,73
Glicerol	20417,25	3,61

Fonte: Próprio autor.

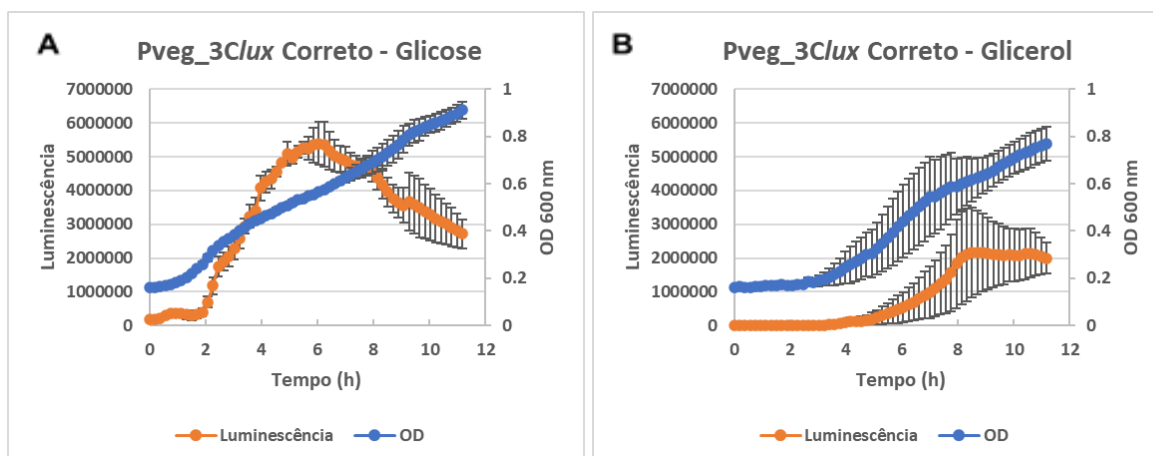
7. Parte 5 - Caracterização das partes e do circuito em Glicose e Glicerol

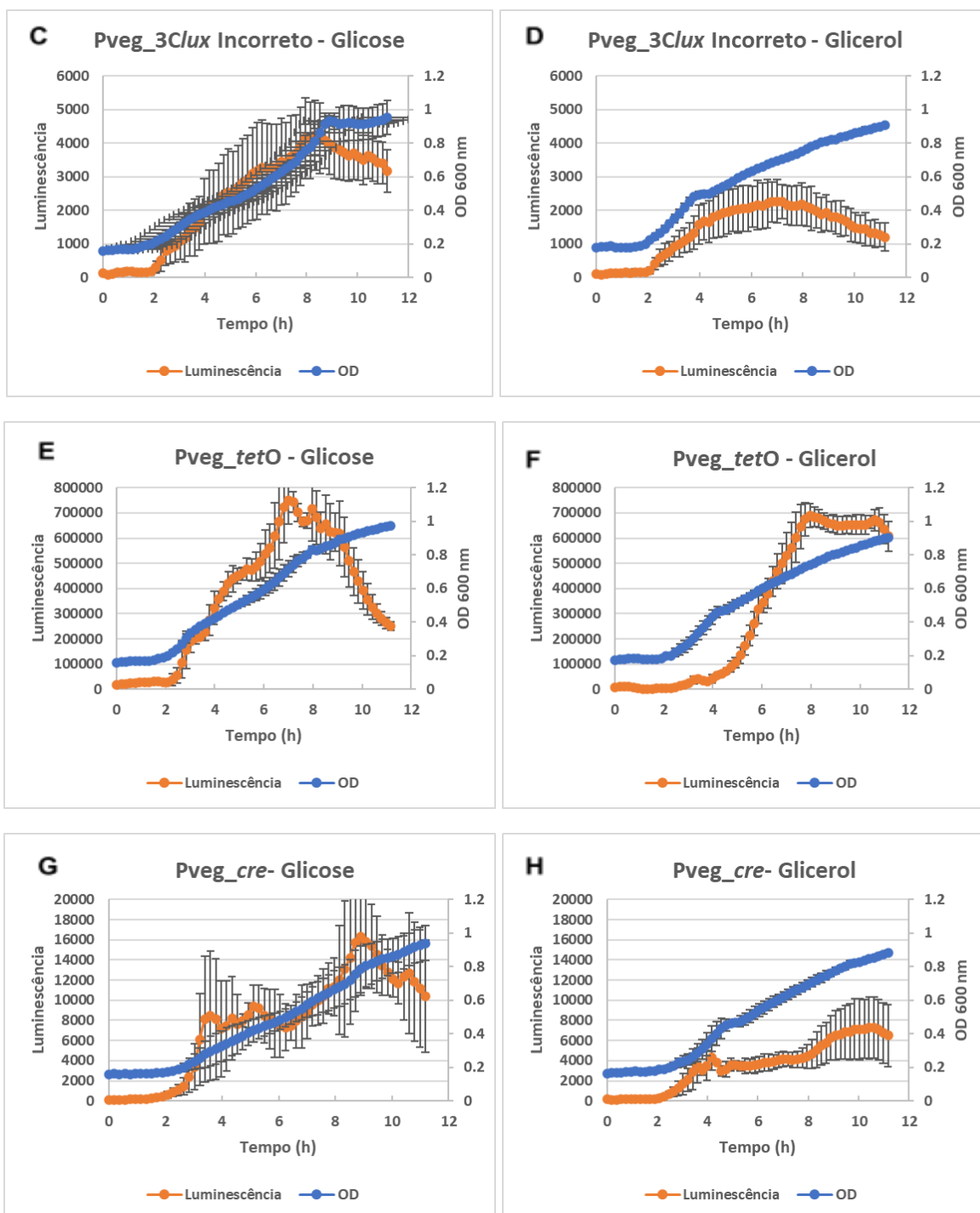
A etapa final de caracterização do circuito envolveu novos testes, desta vez em meio Power suplementado com glicose e glicerol, a nova fonte não responsiva ao RCC que substituiu a lactose pela vantagem de apresentar maior adaptabilidade ao crescimento de *B. subtilis*.

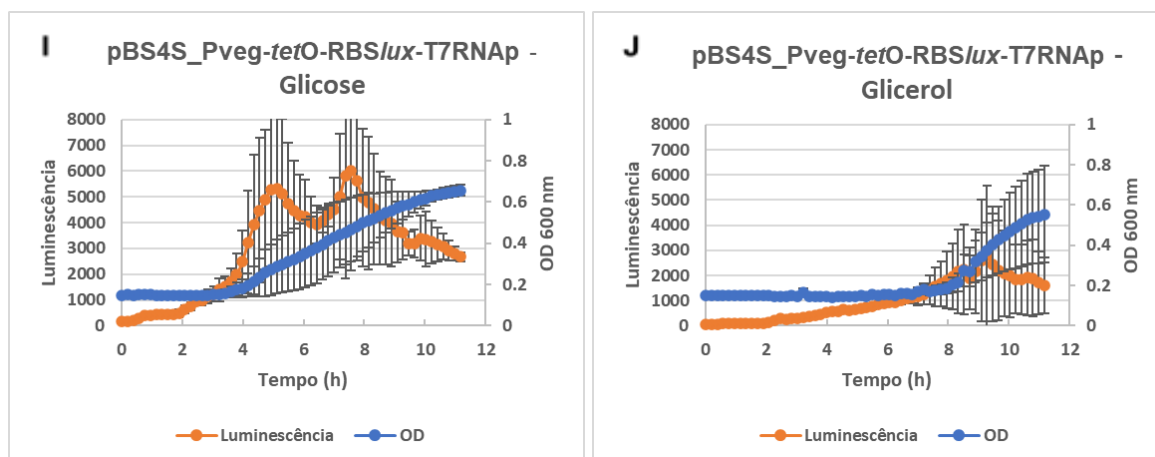
7.1. Resultados Parte 5 - Caracterização em Power com Glicose e Glicerol

A caracterização não envolveu dessa vez o circuito biossensor, uma vez que ele já havia sido caracterizado nos tópicos 5 e 6. Dessa vez, o foco foi observar o comportamento dos promotores, Pveg-*cre* e Pveg-*tetO*, além do circuito intermediário, isto é, pBS4S_Pveg-*tetO*-RBS*lux*-T7RNAP e das construções Pveg_3*Clux* e Pveg_3*Clux* incorreto, as duas últimas herdadas, como mencionado na Parte 1 de RIBEIRO, N. V (2020). Como as discrepâncias entre as densidades celulares dos cultivos em glicose e glicerol são muito pequenas, optou-se por apenas expor os resultados diretos, sem ajustes no formato Luminescência/OD. Os dados estão na Figura 19, abaixo.

Figura 19 - Caracterização dos promotores e demais circuitos em glicose e glicerol.







Caracterização dos promotores e circuitos parciais em Power suplementado com 1% de glicose e glicerol. **A:** curvas de densidade celular e emissão de luminescência para a linhagem de *B. subtilis* contendo o plasmídeo Pveg_3C*lux* em meio Power suplementado com 1% de glicose. **B:** idem em meio Power suplementado com 1% de glicerol. **C:** curvas de densidade celular e emissão de luminescência para a linhagem de *B. subtilis* contendo o plasmídeo Pveg_3C*lux* incorreto em meio Power suplementado com 1% de glicose. **D:** idem em meio Power suplementado com 1% de glicerol. **E:** curvas de densidade celular e emissão de luminescência para a linhagem de *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3C*lux*_Pveg-*tetO* em meio Power suplementado com 1% de glicose. **F:** idem em meio Power suplementado com 1% de glicerol. **G:** curvas de densidade celular e emissão de luminescência para a linhagem de *B. subtilis* contendo o plasmídeo pBS3C*lux*_Pveg-*cre* em meio Power suplementado com 1% de glicose. **H:** idem em meio Power suplementado com 1% de glicerol. **I:** curvas de densidade celular e emissão de luminescência para a linhagem de *B. subtilis* PT7*lux* contendo o plasmídeo pBS4S_Pveg-*tetO*-RBS*lux*-T7RNAp em meio Power suplementado com 1% de glicose. **J:** idem em meio Power suplementado com 1% de glicerol.

Fonte: Próprio autor.

Os resultados acima mostram pontos positivos e negativos a serem debatidos. Tratando inicialmente dos positivos, ambas as caracterizações das construções Pveg_3C*lux* e da homóloga incorreta comportaram-se como esperado. Fortíssima emissão para glicose e glicerol na construção correta, com a glicose por ser a fonte de carbono preferencial tendo uma emissão de luminescência aproximadamente três vezes maior que a observada para o glicerol, exatamente como esperado.

Ponto interessante para destaque e comparação é a magnitude dessa emissão em Power comparada à emissão em LB. Como mostrado na Parte 1, a expressão desse circuito em LB atingiu uma emissão de aproximadamente 2 a 2,5 $\times 10^6$ tanto para glicose quanto para lactose. Dessa vez, a emissão manteve-se na

mesma faixa para o glicerol, mas houve um descolamento forte observado no cultivo com glicose, tendo a emissão atingido patamares três vezes mais altos, em torno de 6×10^6 .

Aqui cabe um adendo, pois isso provavelmente é explicado pelo meio Power ser mais rico em nutrientes, favorecendo a expressão do circuito. Houve discrepâncias consideráveis entre os crescimentos celulares de glicose deste para o primeiro teste de caracterização, uma vez que apesar da emissão de luminescência ter sido significativamente mais alta, a densidade celular máxima foi cerca de 25% menor. Essa comparação não pode ser feita para o glicerol, uma vez que não existem resultados de cultivos de LB suplementado com glicerol, mas em uma comparação superficial com a lactose, os resultados são aproximados para todos os circuitos testados. A redução do crescimento para os cultivos com glicose foi observada nas demais estruturas e circuitos testados. É provável, de algum modo, que o meio Power estimule a expressão do circuito, com algum prejuízo ao crescimento celular dos cultivos, mas isso carece de mais estudos.

Voltando a análise dos resultados de luminescência, não há nada de novo para destacar sobre a construção *Pveg_3C/lux* incorreta, uma vez que pelas inconsistências já mencionadas de sua sequência, não era esperada emissão de luminescência.

Em relação ao promotor *Pveg-tetO*, os resultados corroboram a confiabilidade, sensibilidade e robustez da estrutura desenvolvida, uma vez que houve resposta positiva para a emissão de luminescência tanto para glicose, quanto para lactose. Curiosamente, o resultado obtido para Power com glicose é inferior ao registrado em LB com glicose, cerca de 41%, resultado talvez explicado pela menor densidade celular registrada. O ponto negativo desse resultado fica a cargo da luminescência registrada em Power e glicerol, que foi equivalente à registrada no cultivo com glicose, muito diferente do observado com a lactose na Parte 1.

Os pontos de maior problema nessa etapa ficam para as caracterizações do promotor *Pveg-cre* e do circuito não regulado *pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP*. No primeiro caso, não houve inversão do sinal, como era de se esperar nesse cultivo, ou seja, maior emissão de luminescência no cultivo com glicerol em comparação ao cultivo com glicose. Apesar de haver crescimento celular considerável, nem mesmo o cultivo do promotor *Pveg-cre* em glicose comportou-se como esperado, resultado onde havia certa expectativa de resposta positiva pela

caracterização deste promotor em LB. Esse dado, somado ao resultado pífio de emissão de luminescência em Power e glicerol, induz a hipótese de contaminação deste cultivo como explicação mais plausível para o resultado obtido.

Por fim, em relação ao circuito *pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAp*, os resultados para ambos os cultivos, foram aquém do esperado, com emissão de luminescência baixa em ambos, quando a expectativa era de emissão contundente nas duas situações em razão da ausência da regulação via promotor *Pveg-cre*. No resultado de Power com glicose ainda é possível verificar um platô de emissão durante boa parte do cultivo, o que tende a indicar emissão constante, mesmo que em baixa magnitude. O resultado em glicerol não é aproveitável. Talvez essa situação seja decorrente do baixo crescimento celular de ambos os cultivos, os quais não superaram a ordem de 0.5, muito abaixo do comumente esperado para essas fontes. Não houve tempo hábil para refazer esses cultivos.

Ainda assim, esses resultados problemáticos na caracterização das partes em Power e especificamente em Power e glicerol não representam um problema à boa avaliação do que aqui foi apresentado. Os promotores foram bem caracterizados em LB e mostraram-se em diversos testes robustos, sensíveis e confiáveis. Além disso, o mais importante, o circuito biossensor montado a partir desses dois promotores comporta-se como esperado para todas as fontes de carbono testadas, sendo também altamente sensível e robusto.

8. Conclusão

O presente trabalho é um avanço significativo em várias frentes. O sucesso alcançado ao longo do seu desenvolvimento impactará positivamente projetos futuros do laboratório onde foi desenvolvido no curto prazo, mas também representa um avanço importante para a literatura associada como um todo.

Inicialmente, é importante destacar o sucesso da montagem de dois novos promotores totalmente novos para compor a *toolbox* de partes biológicas para *B. subtilis*. Tanto o promotor Pveg-*cre*, quanto o Pveg-*tetO* são os primeiros desse formato. Uma busca pela literatura trouxe dificuldades em obter comparações a serem apresentadas para este trabalho, pois como exemplificado no capítulo de Desenvolvimento deste trabalho, os promotores desenvolvidos para aplicação em *B. subtilis* não apresentam variações significativas e controles sofisticados de regulação metabólica.

O uso das palavras chave “*B. subtilis*”; “Pveg”; “TetR”; “*tetO*” e “*cre*” de modo associado em plataformas de busca especializadas retornou poucos resultados aproveitáveis. O que se descobriu é que apesar do promotor Pveg (HAWKINS et al., 2020), do sítio operador *tetO* e do gene de repressão da proteína TetR (KAMIONKA; BERTRAM; HILLEN, 2005; FU et al., 2022) já terem sido utilizados separadamente em *B. subtilis*, eles nunca foram utilizados juntos em uma mesma construção. Tampouco foram encontradas informações relevantes sobre a utilização do sítio *cre* em associação ao promotor Pveg.

Isso permite afirmar que os promotores desenvolvidos neste trabalho são os primeiros do tipo para aplicação em *B. subtilis*. Eles possuem graus de sofisticação de controle metabólico elevados e inovadores. Os resultados obtidos nos testes de funcionalidade mostram ainda que são altamente sensíveis, de resposta robusta e adaptáveis para o uso em sistemas mais complexos e elaborados, prova disso, o funcionamento do circuito biossensor construído utilizando ambos os promotores concomitantemente.

Representam ainda um avanço importante não só na expansão da *toolbox* de *B. subtilis*, mas contribuem para tornar essa bactéria em um chassi mais interessante para aplicações farmacêuticas. Por ser uma bactéria gram-positiva, o *B. subtilis* apresenta facilidade em exportar moléculas de interesse através de sua

membrana celular, mais fina que a de bactérias gram-negativas como a *E. coli*. Esta característica natural somada à crescente *toolbox* para a bactéria a transformaram em um chassi mais utilizado nos últimos anos, contudo, a ausência de partes biológicas mais sofisticadas e metabolicamente reguladas ainda inviabiliza a utilização do *B. subtilis* como chassi de produtos mais complexos que necessitam de um processo mais elaborado de produção, nesse caso específico na indústria farmacêutica.

Este trabalho contribui enormemente para reduzir esse déficit e promove o *B. subtilis* como um chassi potencial para novas aplicações na área, e mais do que isso, os resultados do biossensor mostram que o *B. subtilis* possui amplo potencial de ser aplicado como probiótico. Muitos estudos ainda precisam ser feitos para que esse potencial seja verdadeiramente desbloqueado e o circuito ainda precisa ser melhor caracterizado antes das novas etapas de desenvolvimento de um probiótico capaz de identificar e eventualmente tratar doenças associadas ao excesso de açúcar no organismo, como o diabetes.

O primeiro passo nesse sentido foi dado nesse e os resultados promissores obtidos aqui indicam potencial animador para os próximos anos de desenvolvimento em todas as áreas impactadas nesse trabalho.

9. Referências

BAUST, John M.; CAMPBELL, Lia H.; HARBELL, John W. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 10, p. 855-871, 2017.

BENBOUZIANE, Bouasria et al. Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 2, p. 120-129, 2013.

BLAZECK, J.; ALPER, H. S. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. **Biotechnology journal**, v. 8, n. 1, p. 46-58, 2013.

BLENCKE, H-M. et al. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. **Metabolic engineering**, v. 5, n. 2, p. 133-149, 2003.

BRAAT, Henri et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. **Clinical gastroenterology and hepatology**, v. 4, n. 6, p. 754-759, 2006.

BRON S.; MEIMA R., V.D.J.M., WIPAT, A., HARWOOD C. R. (1999) Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* species. **Molecular Biological Methods for Bacillus** (2nd ed) (M., H.C.R.e.C.S. ed), pp. 392-416, American Society for Microbiology (ASM) Press.

CHAN, W.-T. et al. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience reports**, v. 33, n. 6, p. e00086, 2013

CHOI, S-K; SAIER JR, MILTON H. Regulation of sigL expression by the catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 19, p. 6856-6861, 2005.

CHUA, K. J.; KWOK, W. C.; AGGARWAL, N.; SUN, T.; CHANG, M. W. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 40, p. 8–16, 2017.

DEUTSCHER, J. et al. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. **Molecular microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1049-1053, 1995.

DUAN, F. F.; LIU, J. H.; MARCH, J. C. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into glucose-responsive insulin-secreting cells for the treatment of diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 5, p. 1794–1803, 2015.

DUC, L. H. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2161-2171, 2004.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 6, p. 269-275, 2008.

FU, Gang et al. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 11, p. e2119980119, 2022.

GHISHAN, F. K.; KIELA, P. R. From probiotics to therapeutics: another step forward?. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2149-2152, 2011.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 613-624, 2008.

GRUNDY, F. J. et al. Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7348-7355, 1993.

GUIZIOU, S. et al. A part *toolbox* to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 15, p. 7495-7508, 2016.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HAWKINS, John S. et al. Mismatch-CRISPRi reveals the co-varying expression-fitness relationships of essential genes in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Cell systems**, v. 11, n. 5, p. 523-535. e9, 2020.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 813-835, 2005.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-28, 1990.

JONES, B. E. et al. Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 42, p. 26530-26535, 1997.

KAMIONKA, Annette; BERTRAM, Ralph; HILLEN, Wolfgang. Tetracycline-dependent conditional gene knockout in *Bacillus subtilis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 728-733, 2005.

KNIGHT, T. Idempotent vector design for standard assembly of biobricks. 2003.

KUMAR, M. et al. Bioengineered probiotics as a new hope for health and diseases: an overview of potential and prospects. **Future microbiology**, v. 11, n. 4, p. 585-600, 2016.

LEE, N. et al. The prophylactic effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* KU3 against cancer cells. **Journal of functional foods**, v. 14, p. 513-518, 2015.

LEE, N.; KIM, W.; PAIK, H. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. **Food science and biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1297-1305, 2019.

LESER, T. D.; KNARREBORG, A.; WORM, J. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1025-1033, 2008.

LIU, M. et al. Global Transcriptional Programs Reveal a Carbon Source Foraging Strategy by *Escherichia coli**♦. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 15921-15927, 2005.

LIU, D. et al. Construction, model-based analysis, and characterization of a promoter library for fine-tuned gene expression in *Bacillus subtilis*. **ACS synthetic biology**, v. 7, n. 7, p. 1785-1797, 2018.

LIU, Y. et al. Synthetic biology *toolbox* and chassis development in *Bacillus subtilis*. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 548-562, 2019.

MA, Y.; LIU, J.; HOU, J.; DONG, Y.; LU, Y.; JIN, L.; CAO, R.; LI, T.; WU, J. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

MAGASANIK, B. Catabolite repression. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1961. p. 249-256.

MIWA, Y. et al. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 5, p. 1206-1210, 2000.

MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. 1942.

NASERI, G.; KOFFAS, M. AG. Application of combinatorial optimization strategies in synthetic biology. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020.

PARK, S.; SCHUMANN, W. Optimization of the secretion pathway for heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 20, n. 4, p. 623-633, 2015.

POPP, P. F. et al. The Bacillus BioBrick Box 2.0: expanding the genetic *toolbox* for the standardized work with *Bacillus subtilis*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

RADECK, J. et al. 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. 1-17, 2013.

RIBEIRO, N. V. **Construção de um sistema de regulação da expressão gênica responsivo à glicose para bactéria probiótica**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - UNESP, [S. l.], 2020.

SCHUMACHER, M. A. et al. Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. **Cell**, v. 118, n. 6, p. 731-741, 2004.

SINGH, B.; MAL, G.; MAROTTA, F. Designer Probiotics: Paving the Way to Living Therapeutics. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 679–682, 2017.

SHANNON, J. E.; MACY, M. L. Freezing, storage, and recovery of cell stocks. In: **Tissue Culture**. Academic Press, 1973. p. 712-718.

SU, Y. et al. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2020.

TAM, N. KM et al. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2692-2700, 2006.

WEI, P.; YANG, Y.; LI, T.; DING, Q.; SUN, H. A engineered *Bifidobacterium longum* secreting a enbioative penetratin-Glucagon-like peptide 1 fusion protein enhances

Glucagon-like peptide 1 absorption in the intestine. **Journal of microbiology and biotechnology**, 2015.

YANG, H. et al. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 18, p. 6607-6626, 2021.

ZHOU, Z. et al. Engineering probiotics as living diagnostics and therapeutics for improving human health. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2020.

ZOCCA, V. F. B. et al. The CRISPR *toolbox* for the gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 813-826, 2022.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A - Lista de linhagens construídas

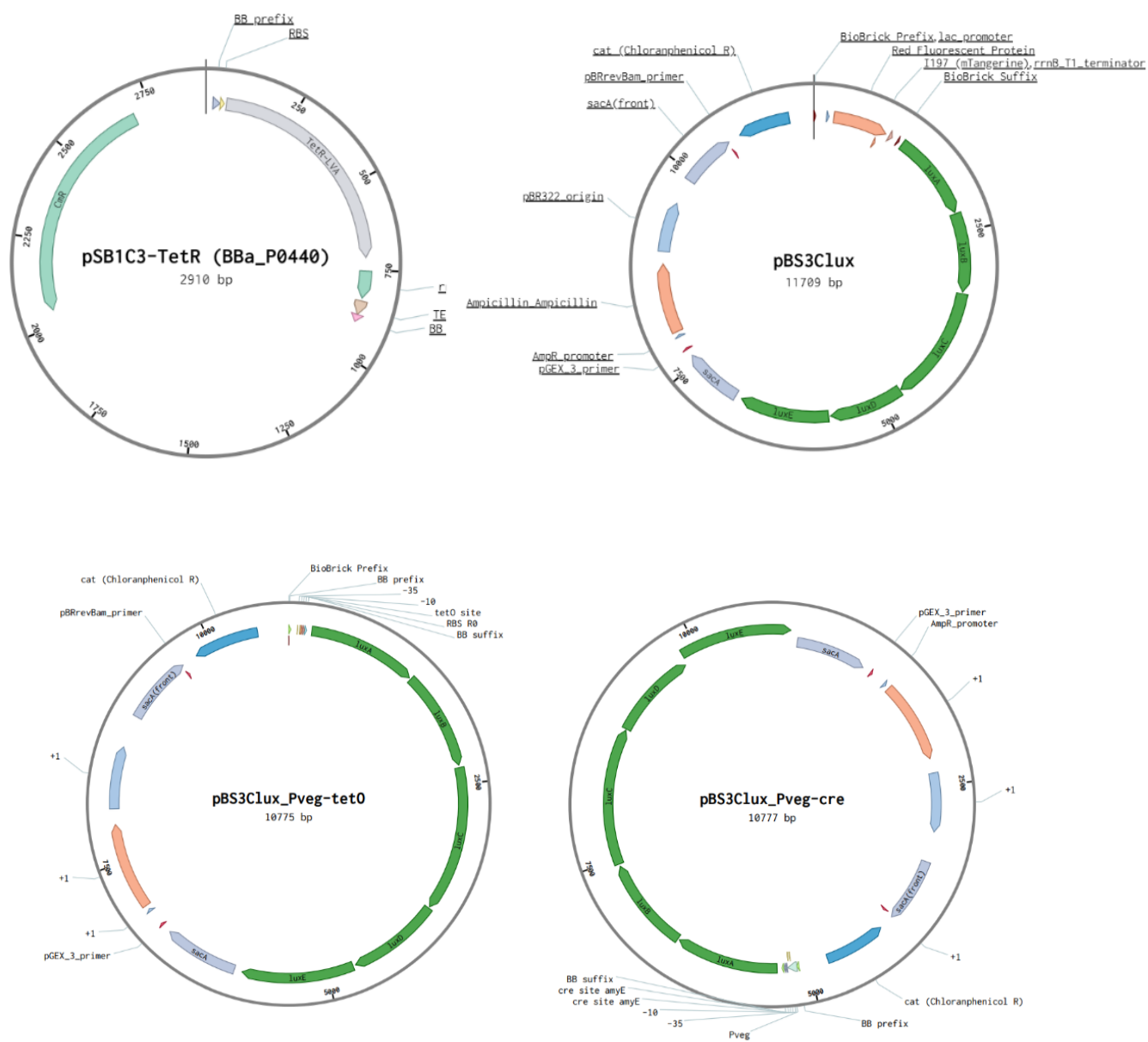
Plasmídeo	Chassi	Descrição	Resistência
pSB1C3_TetR (BBa_P0440)	<i>E. coli</i> Top10	Plasmídeo pSB1C3 contendo a parte BBa_P0440: RBS forte (B0034) + TetR-LVA + double terminator	Cloranfenicol
pBS3Clux	<i>E. coli</i> Top10	BGSC no. ECE261. Shuttle-Vector para integração no locus <i>sacA</i> de <i>B. subtilis</i> contendo operon <i>luxABCDE</i> para bioluminescência	Ampicilina, Cloranfenicol
pBS3Clux_Pveg-tetO	<i>E. coli</i> Top10	Plasmídeo 3Clux com o promotor Pveg-tetO (corrigido: tetO downstream ao Pveg). Apresenta alta luminescência em <i>E. coli</i> .	Ampicilina
pSB1C3_Pveg-cre-TetR	<i>E. coli</i> Top10	Parte do circuito regulatório de controle por glicose. Contém a proteína repressora TetR sob o controle do promotor Pveg-cre, responsivo à glicose.	Cloranfenicol
pBS3Clux_Pveg-cre	<i>E. coli</i> Top10	pBS3Clux contendo genes <i>lux</i> sob controle do promotor Pveg-cre corrigido	Ampicilina
pBS3Clux_Pveg-cre	<i>B. subtilis</i> 168	pBS3Clux contendo genes <i>lux</i> sob controle do promotor Pveg-cre corrigido integrado ao cromossomo no locus <i>sacA</i>	Cloranfenicol
pBS3Clux_Pveg-tetO	<i>B. subtilis</i> 168	<u><i>B. subtilis</i>:Pveg-tetO-lux</u> = Pveg-tetO-lux Operon integrado no locus <i>sacA</i>	Cloranfenicol
pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP	<i>E. coli</i> JM109	Plasmídeo pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO, regulado pela proteína repressora TetR.	Ampicilina
pT73Clux	<i>E. coli</i> Top10	Plasmídeo pSB3Clux com o operon <i>lux</i> sob controle do promotor T7.	Ampicilina
pT73Clux	<i>B. subtilis</i> 168	Plasmídeo pSB3Clux com o operon <i>lux</i> sob controle do promotor T7.	Cloranfenicol
pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	<i>E. coli</i> Top10	pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO, regulado pela proteína repressora TetR, que é controlada por glicose.	Ampicilina
pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	<i>E. coli</i> JM109	pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO, regulado pela proteína repressora TetR, que é controlada por glicose.	Ampicilina
pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	<i>B. subtilis</i> 168	<u><i>B. subtilis</i>:Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP</u> = sistema de controle por glicose da TetR e da T7RNAP integrado ao locus <i>thrC</i>	Espectomicina

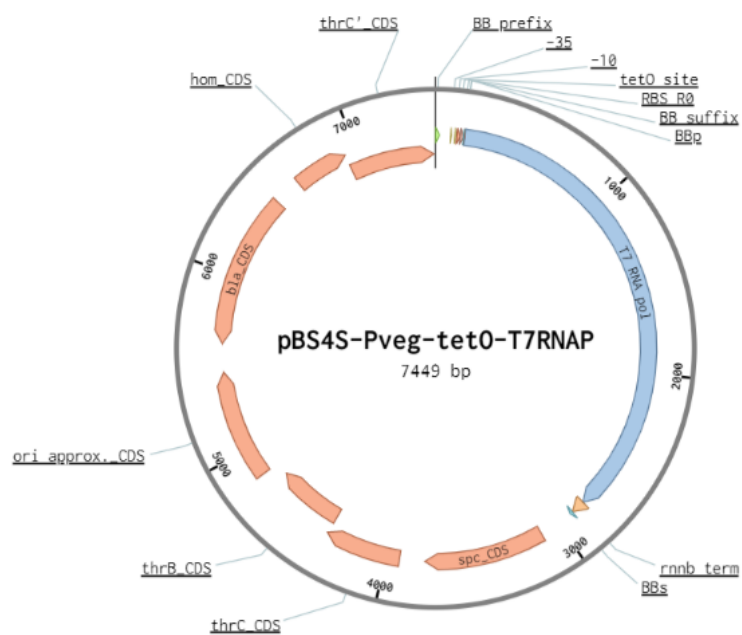
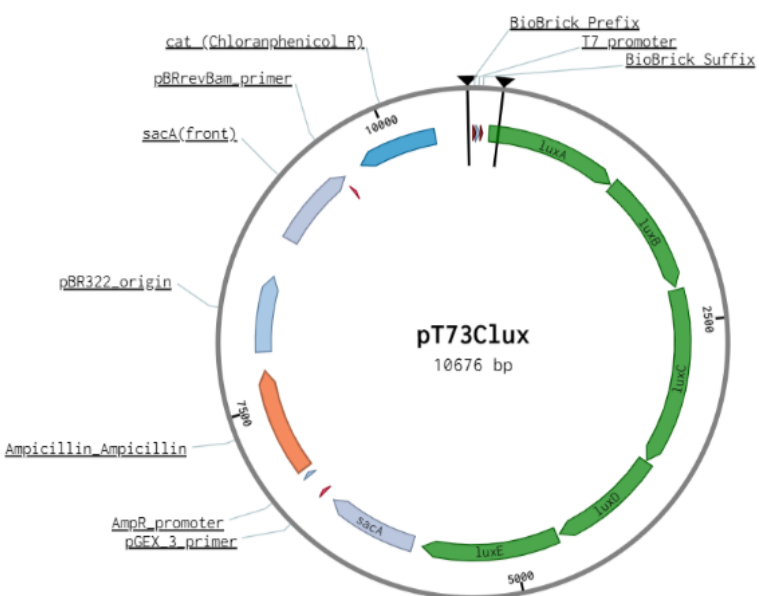
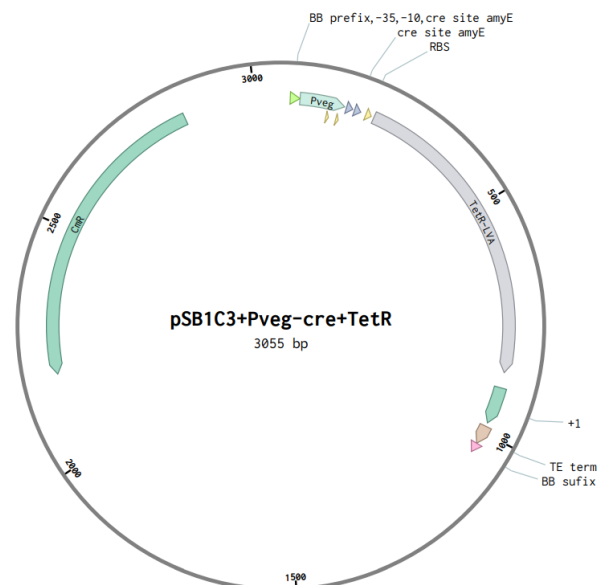
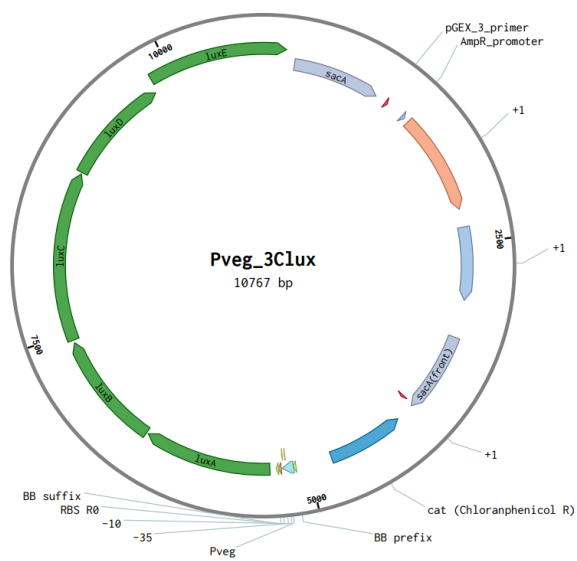
Continua

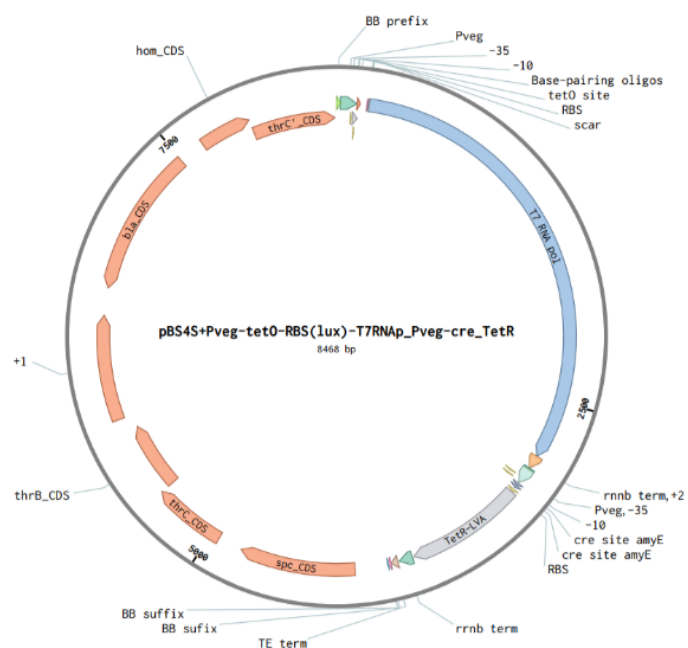
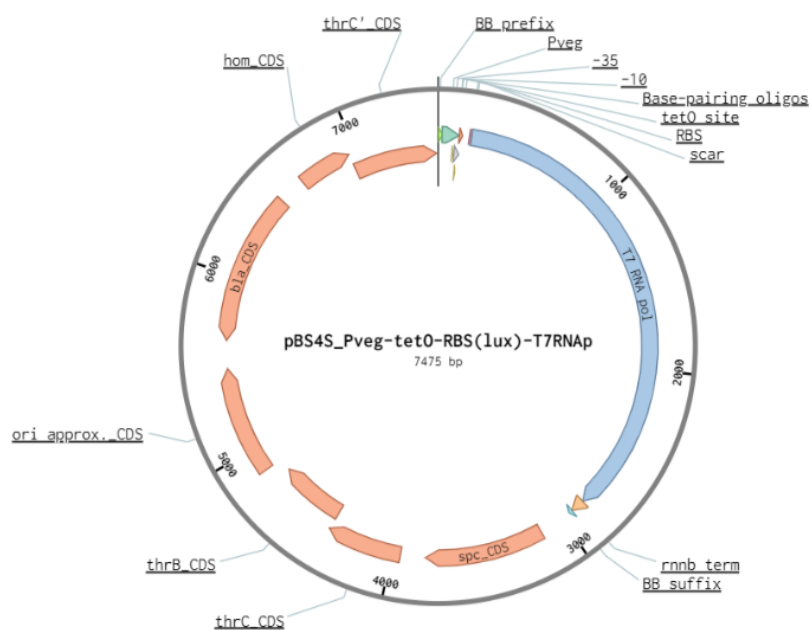
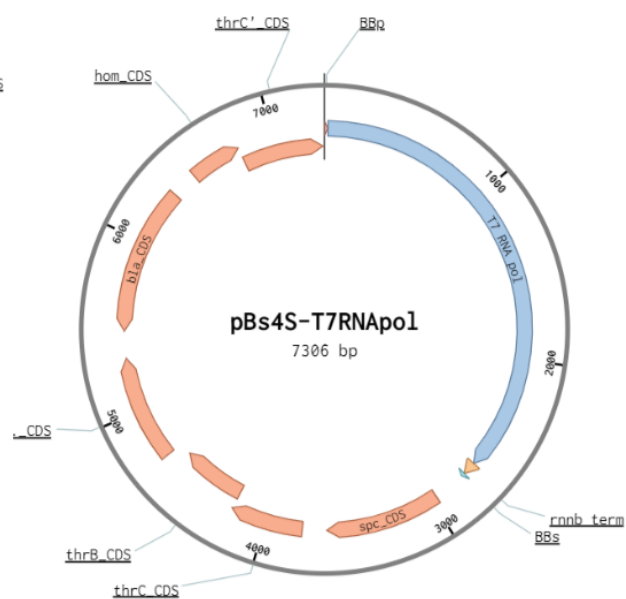
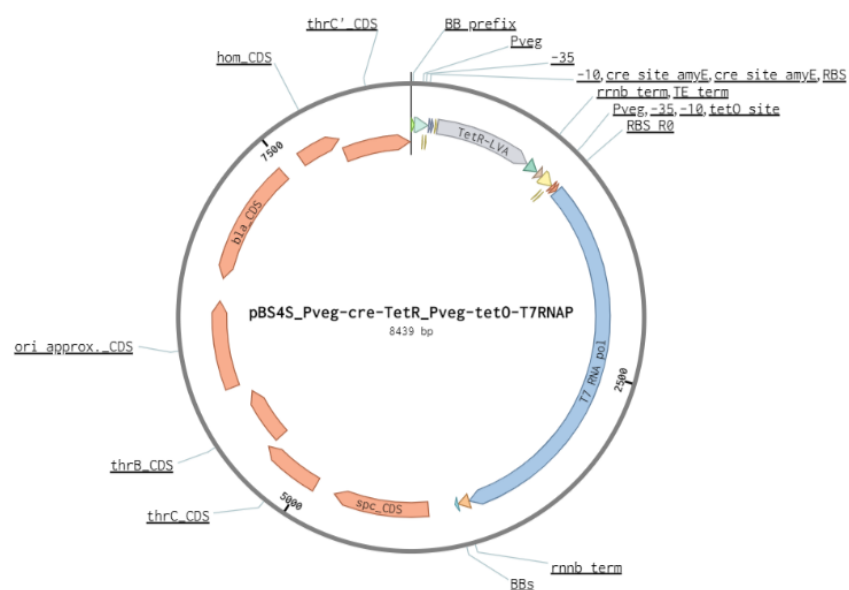
Continuação

pBS4s_Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP	<i>B. subtilis</i> PT7/lux	<u><i>B. subtilis</i>:PT7-lux::Pveg-cre-TetR_Pveg-tetO-T7RNAP</u> = sistema de controle por glicose da TetR e da T7RNAP integrado ao locus thrC, resultando em expressão do Operon lux	Cloranfenicol e Espectiomicina
pBS4S_Pveg-tetO-T7RNAP	<i>B. subtilis</i> PT7/lux	Plasmídeo pBS4S com o gene para produção de T7 RNA Polimerase em <i>Bacillus subtilis</i> , sob o controle do promotor Pveg-tetO, constitutivo na ausência da proteína repressora TetR.	Cloranfenicol e Espectiomicina
pBS4S_T7RNAP	<i>E. coli</i> JM109	Plasmídeo pBS4S contendo o gene da T7 RNA polimerase + terminador rmb.	Ampicilina
pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP	<i>E. coli</i> JM109	Plasmídeo pBS4S contendo RBS (lux) anterior ao gene da T7RNAP	Ampicilina
pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP	<i>B. subtilis</i> PT7/lux	Plasmídeo pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO + RBS (lux) integrado ao cromossomo e ao operon lux	Cloranfenicol e Espectiomicina
pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP_Pveg-cre-TetR	<i>E. coli</i> JM109	pBS4S com o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor Pveg-tetO, regulado pela proteína repressora TetR, que é controlada por glicose.	Ampicilina
pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP_Pveg-cre-TetR	<i>B. subtilis</i> PT7/lux	<u><i>B. subtilis</i>:PT7-lux::Pveg-tetO_RBS(lux)-T7RNAPPveg-cre-TetR</u> = sistema de controle por glicose da TetR e da T7RNAP integrado ao locus thrC, resultando em expressão do Operon lux	Cloranfenicol e Espectiomicina
pBS4S_Pveg-tetO-RBS/lux-T7RNAP_Pveg-cre-TetR	<i>B. subtilis</i> 168	<u><i>B. subtilis</i>:Pveg-tetO_RBS(lux)-T7RNAPPveg-cre-TetR</u> = sistema de controle por glicose da TetR e da T7RNAP integrado ao locus thrC, resultando em expressão do Operon lux	Cloranfenicol e Espectiomicina

APÊNDICE B - Mapa de plasmídeos





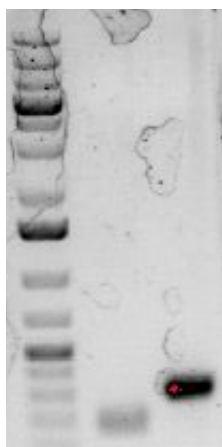


APÊNDICE C - Oligos usados

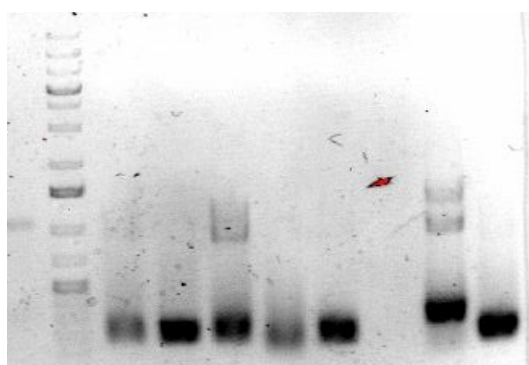
Oligo	Sequência 5' - 3'	Tm °C
BBprefix_fw	ATGAGAATTCGCGGCCGCTTCTAG	61.3
BBsuffix_rv	CGGACTGCAGCGGCCGCTACTAG	66.7
luxA(seq)_rev)	GCTGTGGGAAGAACAATAGC	55
Pveg-cre(amyE) forward	AGTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGAATTTTGT CAAAATAATTTTATTGACAACGTCTTATTAACGTTG ATACCGGTTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTC GTGTTGTAC	67.8
Pveg-cre(amyE) reverse	ATATCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATAAATGTAA GCGTTAACAAAATTGTAAGCGTTAACAAAATACAT TTATTGTACAACACGAGCCCATTTTTGTCAAATAA AATTTAACC	67.8
Pveg-tetO-RBS(lux)_fw	ATGAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGAATTTTGT CAAAATAATTTTATTGACAACGTCTTATTAACGTTG ATACCGGTTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTC GTGTTGTACAATAAATGTA CTCTATC	70
Pveg-tetO-RBS(lux)_rv	CGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTATCCTCCTGT CGACCTTACTAGGACACCTTGCCCTTTTTTGCCG GAACTCTATCAATGATAGAGTACATTTATTGTACA ACACGAGC	75

APÊNDICE D - Géis de eletroforeses

- a) **Ligação pBS3C*lux*_Pveg-cre-TetR:** o gel representado na figura mostra duas bandas: uma menor de de aproximadamente 150 pb que representa apenas parte do promotor Pveg, enquanto a outra, positiva, com aproximadamente 300 pb mostra uma PCR bem sucedida em uma região que contempla promotor Pveg com dois sítios *cre* e parte do início do gene de síntese da TetR.

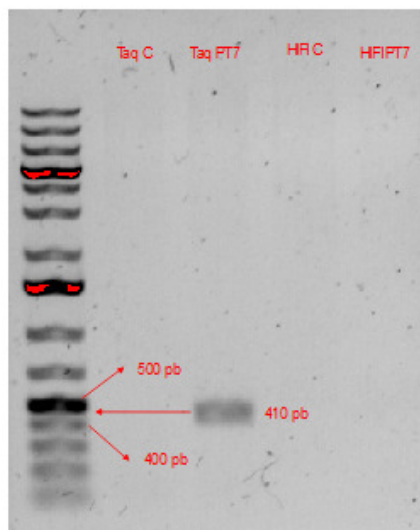
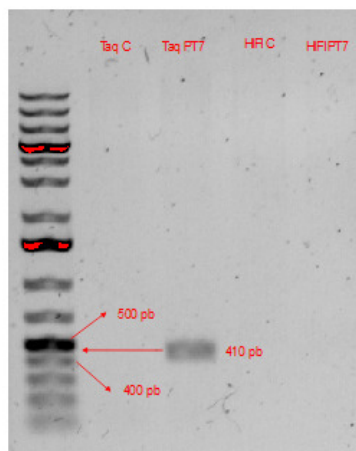


- b) **PCR de colônia da clonagem da construção pBS3C*lux*_Pveg-cre-TetR em *B. subtilis*:** A PCR abaixo é semelhante à anterior, tratando-se da transformação do *B. subtilis* com o plasmídeo pBS3C*lux*_Pveg-cre-TetR, cuja construção foi confirmada em *E. coli* na figura “a”. Há apenas uma banda positiva.

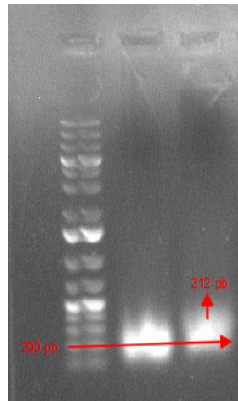


- c) **Confirmação pT73C*lux* - Time HIFI e Taq Polimerase:** a figura representa a PCR de colônia realizada para confirmação da transformação do *B. subtilis* com o plasmídeo pT73C*lux*. A banda de 410 pb representa a transformação bem sucedida. Foram usadas duas enzimas DNAPolimerase, a Time HIFI e a

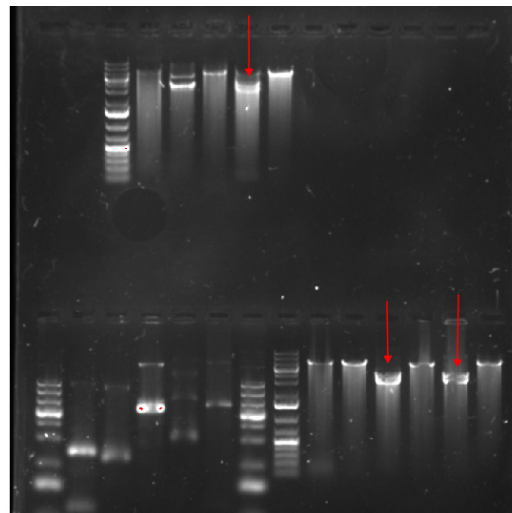
Taq pois nesse momento havia problemas sucessivos de PCRs no laboratório e havia suspeita de que as enzimas pudessem estar com algum problema.



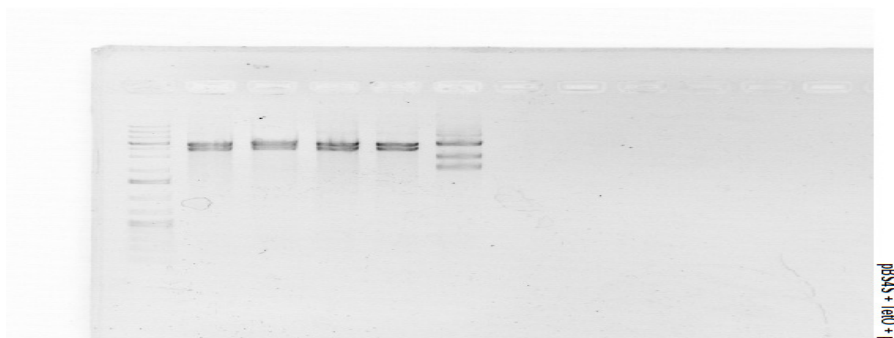
Oligos RBSlux: a figura abaixo mostra o resultado do anelamento dos oligos complementares usados na montagem do promotor Pveg-*tetO*-RBSlux. Um banda de 212 pb seria positivo do anelamento. A amostra positiva foi colocada em outro gel sem a presença de brometo, recortada e purificada para uso.



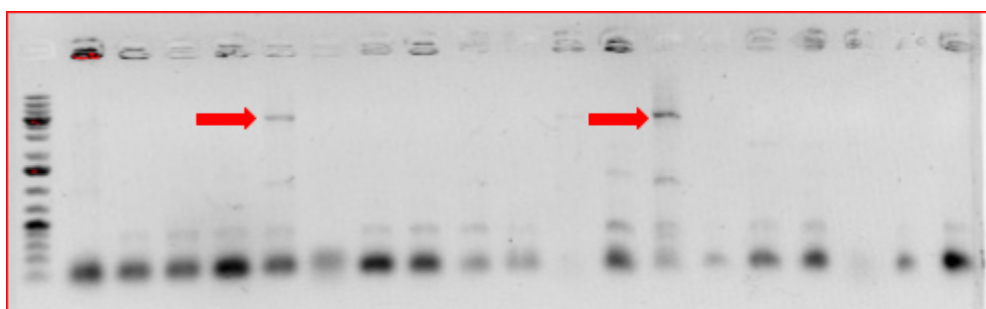
- d) **Confirmação ligação Pveg-*tetO*-RBS*lux* no pBS4S_T7RNAp:** a figura representa a confirmação da ligação do inserto Pveg-*tetO*-RBS*lux* no plasmídeo pBS4S_T7RNAp. As duas bandas próximas de aproximadamente 4000 e 3000 pb foram geradas pela digestão do inserto com a enzima Sall, com dois sítios de restrição no plasmídeo, sendo o segundo, justamente no inserto adicionado.



- e) **Confirmação pBS4S_Pveg-*tetO*-T7RNAp_Pveg-*cre*-TetR:** PCR confirmando a ligação do inserto Pveg-*cre*-TetR no plasmídeo pBS4S_Pveg-*tetO*-RBS*lux*-T7RNAp. Digerido novamente com a enzima Sall, dessa vez com duas bandas (em caso positivo), de aproximadamente 5000 e 3000 pb, havendo 4 positivas na imagem.



f) **Biosensor completo:** Transformação do *B. subtilis* com o plasmídeo pBS4S_Pveg-*tetO*-RBS/*lux*-T7RNAP_Pveg-*cre*-TetR.



11. ANEXO

ANEXO A – Reações e Meios

Anelamento dos oligos

1. Diluir os oligos para 10 uM (prepare 50 uL em um eppendorf). Um tubo para o forward outro para o reverse;
2. Em outro tubo misture: 40 uL do forward + 40 ul do reverse + 20 ul de tampão de eluição do kit de extração da Promega®;
3. Coloque o tubo da etapa 2 no termobloco a 98°C (ligue antes para aquecer). Deixe por 10 min;
4. Desligue o termobloco e espere baixar a temperatura até ~40°C. Tire o tubo do bloco e deixe na bancada até equilibrar com a temperatura ambiente;
5. Quantificar.

PCR de preenchimento - TIME HiFi DNA polimerase

1. Preparar o termociclador:
 - Duas etapas;
 - 103°C para a tampa;
 - 72°C por 40 min;
 - 15°C por 5 min;
 - Colocar em pausa até terminar de montar a reação.
2. Preparar tudo no gelo - Em um microtubo de PCR (200 uL) adicionar:
 - 10 µl Tampão TIME 5x
 - 1 µl dNTPs 10mM (aliquota no tubinho de 200 ul)
 - 10 µl Oligos anelados
 - 28.5 µl de H₂O mili-Q
 - 0.5 µl TIME DNA pol.

3. Terminado de montar a reação, agite suavemente batendo com o dedo no fundo do tubo por 3x. Coloque no termociclador.

Digestão de plasmídeo (volume = 30 ul)

1. Montagem da reação
 - 3 ul de Fast Digest Buffer 10X;
 - X ul de plasmídeo (~800 ng);
 - X ul de enzimas (1 ul de cada)
 - 1 ul FastAP;
 - X ul Água mili-Q (completar para 30 ul).
2. Incubar a Y°C e fazer Reação Overnight (~18h).

Digestão oligos (volume = 20 ul)

1. Montagem da reação
 - 2 ul de Fast Digest Buffer 10X;
 - X ul de oligos (1000 ng) extendidos e purificados;
 - X ul de enzimas (1 ul de cada)
 - X ul de Água mili-Q (completar para 20 ul).
2. Incubar a X°C e fazer Reação por Xh.

Reação de Ligação – T4 DNA Ligase (volume final = 10 ul)

1. Montagem da reação
 - 1 ul de 10X T4 DNA ligase buffer;
 - X ul (20 ng) de plasmídeo;
 - X ul (1:100) de inserto (oligos anelados e digeridos);
 - 0.5 ul de T4 DNA ligase;
 - X ul de Água mili-Q (para 10 ul).

2. Incubar a reação por 1 hora a 22°C.

PCR de colônia – Taq Polimerase (Cellco®) (volume = 50 ul)

1. Montagem da reação

- 5 ul de 10X Taq Reaction Buffer;
- 1 ul de 10 mM dNTPs;
- 1 ul de 10 uM oligo forward (BBprefix_fw);
- 1 ul de 10 uM de oligo reverse (Seq_tetR_fw);
- 1 colônia isolada;
- 0.5 ul de Taq DNA polimerase;
- 39.5 ul de Água mili-Q.

2. Reação no termociclador

• Desnaturação inicial	95 °C	1 min	1 X
• Desnaturação	95 °C	30 s	}
• Hibridização*	55 °C	30 s	
• Elongação**	72 °C	x min	30 X
• Elongação final	72 °C	2 min	1 X

* determinada pelos oligos utilizados

**1 min/kb

Transformação *E. coli* Top10

1. Colocar *E. coli* competente no gelo e esperar derreter (caso esteja no -80°C). Para cada transformação são usados 50µL, pegue quantidade suficiente para as transformações e controles.

Obs. Trabalhe sempre no gelo com as células competentes.

2. Adicione 20-50 µg de plasmídeo intacto ou 50-100 µg de reação de ligação a 50µL de células competentes.

3. Incube no gelo por 30 min.
4. Choque-térmico: coloque a mistura célula + DNA em banho-maria a 42°C por 30 segundos e imediatamente transfira as células para o gelo e incube por 2 min.
5. Adicione 250µL de meio SOC a cada transformação e incube por 1h a 37°C e 220 rpm ou mais.
6. Plaquear as células transformadas em meio LB-ágar contendo o antibiótico correto. Espalhar bem a solução pela placa até secar todo o líquido. Incubar a 37°C durante a noite (12h a 18h).

Transformação de *B. subtilis* 168

1. Descongele o volume necessário de célula competente de *B. subtilis* 168 em banho-maria a 37°C.
2. Adicione 250 ul de células competentes a um eppendorf de 1.5 ml estéril.
3. Adicione 250 ul de meio SpII + EGTA e misture gentilmente.
4. Adicione x ul de plasmídeo (volume para 500 ng).
5. Incube por 1h30 a 37°C e 220 rpm.
6. Plaquear em placa com LB-ágar + antibiótico apropriado e deixar crescer overnight (12-18h).

Sequenciamento

Reação de Sequenciamento Big Dye Mix *	
Componentes	Volume Total (20 ul)
Big Dye Mix **	1,0 ul
Tampão de Sequenciamento 5X	3,5 ul
Primer	2,0 ul (3,2 uM)
Amostra de DNA	2,0 ul (3,2 uM)
Água Mili-Q autoclavada	11,5 ul

*Componentes fornecidos pela Applied Biosystems

**Big Dye Mix contém: dNTPs; ddNTPs; AmpliTaq DNA polimerase; MgCl₂; tampão Tris-HCl

Condições da Reação

Temperatura	Tempo	Nº ciclos
96°C	1 minuto	1X
96°C	10 segundos	
Temperatura melting primer	5 segundos	25X
60°C	4 minutos	
60°C	5 minutos	1X
4°C	infinito	**

Meios utilizados

Lúria-Bertani (LB – 1L)

1. 10 g de triptona;
2. 5 de extrato de levedura;
3. 10 g de NaCl;
4. Ajustar pH para 7,0 – 7,2.
5. Caso o meio seja sólido, adicionar 15 g de ágar;
6. Completar volume com água;
7. Autoclavar.

SOC (1L)

1. 5 g de extrato de levedura;
2. 20 g de triptona;
3. 0,584 g de NaCl;
4. 0.186 g de KCl;
5. 2,4 g de MgSO₄;
6. Ajustar pH para 7,5;
7. Após autoclavar adicionar 20 ml de solução de glicose 20% (w/v).

SpII

1. 200 ml de base T;
2. 2 ml de glicose 50% (v/v);

3. 14 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,2% (w/v);
4. 2 ml de extrato de levedura 10% (w/v);
5. 2 ml de casaminoácidos 1% (w/v);
6. 1 ml de CaCl_2 0,1 M;
7. Fatores de crescimento (se necessário).

Base T (1 L)

1. 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
2. 18,3 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$;
3. 6 g de KH_2PO_4 ;
4. 1 g de citrato de sódio. $2\text{H}_2\text{O}$.

SpII + EGTA

1. Adicione 200 ml de SpII com 4 ml de EGTA 0,1 M e pH 8,0;
2. Congele em alíquotas a - 20°C.

POWER (P/ 1L)

- X gramas de fonte de carbono desejada (p/ x% v/v)
- 1 g/L de Extrato de levedura
- 25 g/L de Nitrato de sódio (NaNO_3)
- 0,333 g/L de Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)
- 1g/L de Fosfato dissódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- 0,15 g/L de Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 7,5 mg/L de Cloreto de cálcio (CaCl_2)
- 6 mg/L de Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 6 mg/L de Sulfato de ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

- Ajustar o pH para 7,0 antes de autoclavar