



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELA BARBOSA DE PAIVA

**Desenvolvimento de Plataforma Bacteriana para Produção de
Biofármacos**

ARARAQUARA, SP

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Desenvolvimento de Plataforma Bacteriana para Produção de Biofármacos

Documento apresentado ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Unesp/Araraquara
para a Defesa de Dissertação do Mestrado.

Orientando: Gabriela Barbosa de Paiva

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

Araraquara, SP

2021

P149d

Paiva, Gabriela Barbosa de.

Desenvolvimento de Plataforma Bacteriana para Produção de Biofármacos / Gabriela Barbosa de Paiva. – Araraquara: [S.n.], 2021. 85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Bacteriologia.

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. Asparaginase. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Biofármacos. 4. Biologia Sintética. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.

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

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de plataforma bacteriana para produção de biofármacos

AUTORA: GABRIELA BARBOSA DE PAIVA

ORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELLE BISCARO PEDROLI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. MARIA CAROLINA QUECINE VERDI (Participação Virtual)
Departamento de Genética / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP

Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
UNESP - Araraquara

Araraquara, 16 de julho de 2021

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha orientadora Danielle que acreditou no meu potencial e me deu a oportunidade de realizar este mestrado. A Dani me apresentou para o mundo da Biologia Sintética e me mostrou a infinidade de coisas que esta área nos possibilita construir.

Quero agradecer a todo o grupo de pesquisa SynBio que é composto por pessoas maravilhosas que fizeram a diferença no meu trabalho e tornaram os dias no laboratório ainda melhores.

Também agradeço ao Heitor Bento que me ensinou a fazer os ensaios de atividade enzimática, me acompanhando nos experimentos e até hoje continua me ajudando, não só com experimentos, mas também com muitas dicas sobre a vida acadêmica. Agradeço ao melhor técnico Flávio Picheli, que sempre esteve comigo, desde a graduação, me ajudando e me orientando no laboratório e que se tornou um grande amigo.

Quero agradecer a minha namorada Érica pelo companheirismo, por estar sempre do meu lado. É maravilhoso poder contar com o seu apoio, especialmente nesta fase de finalização de mais um ciclo. Muito obrigada! Agradeço a Milca, a Laura, o Caio, a Vitória e a Arianne. Foi maravilhoso compartilhar a experiência do mestrado com vocês, não só acadêmica, mas também pessoal, espero sempre contar com a amizade de vocês!

Aos meus pais, Ovídio e Heloisa que fizeram, e ainda fazem, muitos sacrifícios para que eu possa estudar e me qualificar. Quero agradecer a minha irmã, Júlia pela sua amizade e por sempre torcer por mim. Agradeço a todos que me acompanharam durante o mestrado.

Resumo

A produção de biofármacos tem crescido rapidamente em todo o mundo. Porém, o processo de produção e purificação destas biomoléculas é bastante custoso. A solução para minimizar tais custos pode estar associada ao desenvolvimento da linhagem produtora. Desenvolver uma plataforma de produção de biofármacos, usando microrganismos que facilitem o processo de extração e purificação da biomolécula, pode gerar grande redução de custos e aumento da recuperação do produto. Além disso, uma plataforma padronizada pode ser útil para a produção de uma grande variedade de biofármacos com reduzido tempo de desenvolvimento individual. Dentro deste contexto, este trabalho consistiu no desenvolvimento de uma plataforma padronizada para a produção de biofármacos, usando a bactéria *Bacillus subtilis* como chassis. Como modelo de biofármaco, a L-Asparaginase II de *Aliivibrio fischeri* foi produzida usando a plataforma construída. Esta enzima apresenta potencial antileucêmico baseado em sua sequência de aminoácidos. O projeto resultou no desenvolvimento de uma linhagem de *B. subtilis* produtora da L-Asparaginase intracelular. Além disso, diferentes peptídeos-sinal foram testados utilizando a Proteína Verde Fluorescente como repórter para avaliar e otimizar a exportação proteica.

Palavras- chave: Asparaginase, *Bacillus subtilis*, Biofármacos, Biologia Sintética.

Abstract

Biopharmaceuticals production has grown rapidly in the World and in Brazil. Many pharmaceutical companies have expanded their role in biopharmaceuticals due to the increased demand. However, the production process for biopharmaceuticals is still costly. Production and subsequent purification of the biomolecule account for most of the cost. Developing a platform for the production of biopharmaceuticals, using microorganisms that facilitate the extraction and purification process of the biomolecule, can generate a great reduction of costs and increase product recovery. In addition, a standardized platform may be useful for the production of a wide variety of biopharmaceuticals with reduced individual development time. Within this context, in this work, we aimed to develop a standardized platform for the production of biopharmaceuticals, using the bacterium *Bacillus subtilis* as chassis. As a biopharmaceutical model, L-Asparaginase II from *Aliivibrio fischeri* was produced using the constructed platform. This enzyme has anti-leukemic potential based on its amino acid sequence. To this moment, a strain producing L-Asparaginase II intracellularly was developed. Moreover, different signal-peptides were tested using the Green Fluorescent Protein as a reporter to evaluate and optimize protein secretion.

Key-words: Asparaginase, *Bacillus subtilis*, Biopharmaceuticals, Synthetic Biology.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Curva padrão para quantificar a amônia liberada na reação de hidrólise de L-Asparagina e, com isso, determinar a atividade da L-Asparaginase II. Na equação, y corresponde à absorbância a 436nm e x à concentração de amônia (mg/mL)28
- Figura 2:** Curva padrão para quantificação de proteínas totais. Na equação, y refere-se à absorbância a 562nm e y à concentração de proteínas (mg/mL).....29
- Figura 3:** Sistema de expressão da L-Asparaginase II intracelular de *A. fischeri* por *B. subtilis*. Na figura, estão representados o promotor P_{veg} , o Sítio de Ligação do Ribossomo (RBS), o gene que codifica a enzima (*ansB* Af) e o terminador da transcrição.....30
- Figura 4:** Duas cópias do gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri* ligadas uma à outra. Cada cópia carrega as sequências do promotor P_{veg} , RBS e terminador da transcrição.31
- Figura 5:** Sistema de exportação para teste dos peptídeos-sinal utilizando a GFP como proteína repórter. Na figura está representada a região promotora $P_{lux3.2}$, o RBS R0, os sítios de reconhecimento da *BsaI*, o gene que codifica a GFP (-ATG) e o terminador da transcrição. As flechas em azul indicam onde a *BsaI* realiza a clivagem removendo seus sítios de reconhecimento os quais serão substituídos pela sequência do peptídeo-sinal.34
- Figura 6:** Sistema de exportação construído para testar diferentes sequências de peptídeo-sinal, utilizando o gene da GFP como repórter. A figura representa a sequência promotora $P_{lux3.2}$, o RBS, o peptídeo-sinal que substituiu os sítios de reconhecimento da *BsaI*, o gene que codifica a GFP e o terminador da transcrição.36
- Figura 7:** Plasmídeo pBSECK-RFP replicativo em *E. coli* e *B. subtilis* construído pelo método Golden Gate. O plasmídeo contém o gene de resistência a canamicina (KanR), o gene que codifica a RFP e as origens de replicação pUCori e ori1030.39
- Figura 8:** Sistema de exportação da L-Asparaginase II, a região promotora é composta pelo promotor sintético $P_{lux 3.2}$. Além disso, a figura representa o RBS, os sítios de reconhecimento da *BsaI*, o gene que codifica a L-Asparaginase II e o terminador da transcrição. As flechas em azul indicam onde a *BsaI* irá clivar e o local onde o NucB será ligado (*upstream* o gene *ansB*). 40
- Figura 9:** Fragmentos resultantes da digestão pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* do plasmídeo gerado na clonagem do gene *ansB* no plasmídeo pBS0EXylR-PxylA. Os fragmentos apresentam os tamanhos 8.035bp e 1221bp, o primeiro referente ao plasmídeo digerido e o segundo ao gene que codifica a L-Asparaginase II após a digestão.41
- Figura 10:** Sequenciamento do pBS0EXylR-PxylA-*ansB*. Seq 1 é a sequência esperada e Seq 2 é a sequência fornecida pelo sequenciador. Em rosa está representado o promotor P_{xylA} , em

roxo o operador, em azul está o Sítio de Ligação do Ribossomo e em vermelho o gene *ansB*. Como demonstrado pela figura, o alinhamento entre as sequências permite concluir que a clonagem funcionou.42

Figura 11: Fragmentos gerados na digestão pela enzima *HindIII* do plasmídeo resultante da clonagem do gene *ansB*, propagado em *E. coli* TOP10, sequenciado e então inserido em *B. subtilis* $\Delta 6$ e do controle negativo das clonagens. A presença de um fragmento de 9.256bp após a digestão dos plasmídeos extraídos de *E. coli* TOP10 e *B. subtilis* $\Delta 6$ e de três fragmentos de 8.479bp, 440bp e 222bp resultantes da digestão do controle negativo indicam que a bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ foi transformada com o pBS0EXylR-PxylA-*ansB*43

Figura 12: Resultado obtido da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do conteúdo celular após rompimento das células de *B. subtilis* $\Delta 6$ contendo o plasmídeo com o gene *ansB* e do controle negativo (não transformado). O tempo t0 refere-se ao cultivo no momento da indução ($OD_{600} = 0,7$) e *ansB* 4h corresponde às células rompidas 4 horas após a indução. Foram aplicados ao gel volumes de extrato celular iguais a 5,0 (colunas 2-4), 10,0 (coluna 5) e 15,0 μ L (coluna 6).....44

Figura 13: Curva de crescimento da bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ transformada com o pBS0EXylR-PxylA-*ansB* (preto) e da bactéria *Bacillus subtilis* $\Delta 6$ não transformada (vermelho).....45

Figura 14: Confirmação da clonagem de uma e duas cópias do gene *ansB* sob controle do promotor constitutivo Pveg. O C+ é o controle positivo (pBS1C(A4481T)-*ansB*), as colunas 1 a 7 correspondem a clonagem de uma cópia do gene *ansB* e a coluna 8 à clonagem de duas cópias deste gene. Os fragmentos de 6.511bp (plasmídeo digerido) 1.335bp (uma cópia do gene *ansB*) nas colunas 1-7 indicam que a clonagem do pBS1K-*ansB* em *E. coli* funcionou. Na coluna 8, a presença das bandas de 6.511bp e 2.730bp (duas cópias de *ansB*) permite concluir que a clonagem de 2 cópias do *ansB* foi bem sucedida.....47

Figura 15: Plasmídeos pBS1K-*ansB* e pBS1K-2x(*ansB*) digeridos pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* e não digeridos. As duas primeiras colunas correspondem ao pBS1K-2x(*ansB*) não digerido e digerido respectivamente. Os fragmentos de 6.511bp (plasmídeo digerido), 2.730bp na segunda coluna indicam a presença de duas cópias do gene *ansB* e o plasmídeo não digerido (primeira coluna) apresenta o tamanho esperado (9.241bp). Nas duas últimas colunas foram adicionados o pBS1K-*ansB* digerido e não digerido respectivamente. Os fragmentos de 6.511bp (plasmídeo digerido), 1.335bp na coluna do pBS1K-*ansB* digerido confirmam a presença de uma cópia do *ansB* e a última coluna demonstra que o plasmídeo possui o tamanho esperado (7.846bp) 48

Figura 16: Sequenciamento do pBS1K-*ansB*. Seq 1 é a sequência esperada e Seq 2 corresponde à sequência fornecida pelo sequenciador. Em azul está representado o promotor P_{veg}, em roxo

o Sítio de Ligação do Ribossomo (RBS) e em vermelho o gene *ansB*. O alinhamento entre as sequências demonstra que a clonagem de uma cópia do gene *ansB* foi bem sucedida. 49

Figura 17: Fragmentos resultantes da PCR de colônia para testar a integração de uma e duas cópias do gene *ansB* nas bactérias *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7. C- (1) e C-(2) são o resultado da PCR de colônia das *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7 não produtoras de L-Asparaginase II, respectivamente. As colunas 1 a 7 são resultantes da PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo integrativo contendo uma cópia do gene *ansB* (1 a 3 referentes à *B. subtilis* KO7 e 4 a 7 à *B. subtilis* $\Delta 6$). De 8 a 13 são os fragmentos obtidos na PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo contendo duas cópias do gene *ansB* (8 a 10 correspondem a *B. subtilis* KO7 e 11 a 13 a *B. subtilis* $\Delta 6$). As transformações foram confirmadas pela presença das bandas de 1340bp nas colunas 1 a 7 e 2.735bp nas colunas 8 a 13.50

Figura 18: Fragmentos obtidos na digestão pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* dos plasmídeos extraídos da *E.coli* JM109 resultantes da clonagem de quatro cópias do *ansB* no plasmídeo pBS1K. C+ consistiu no pBS1K-*ansB* (plasmídeo com uma cópia do gene *ansB*). As colunas 2 a 4 e 7 a 11 correspondem a plasmídeos que contém os fragmentos esperados para a digestão do pBS1K-4x(*ansB*), sendo estes de tamanho 6.511bp (plasmídeo digerido) e 5.431bp (quatro cópias da unidade de transcrição do *ansB*). Dessa forma, concluiu-se que estes plasmídeos eram positivos e, portanto o número 9 foi selecionado para dar continuidade no processo e ser inserido em *B. subtilis*51

Figura 19: Resultado da PCR para testar a clonagem de quatro cópias do gene *ansB*. A reação resultou em diversos fragmentos não específicos, sendo que o esperado era apenas um fragmento de 5.400bp, o que dificultou a confirmação da integração das quatro cópias do gene *ansB* ao genoma da bactéria *B. subtilis*. A confirmação foi realizada pelo teste de degradação do amido descrito posteriormente.....52

Figura 20: Teste de degradação do amido. A placa A consiste no cultivo dos controles negativos *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7 não produtores de L-Asparaginase II e capazes de degradar amido. As placas B e C correspondem a colônias de *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* $\Delta 6$, respectivamente, que possuem uma, duas e quatro cópias do gene *ansB*. A ausência da cor azul ao redor das colônias na placa A significa que o amido foi degradado pelas bactérias, ao contrário do que ocorreu nas placas B e C em que a cor azul das colônias indica a presença de amido, o que permite concluir que as bactérias não estão produzindo amilase e, portanto, apresentam o gene *ansB* integrado ao seu genoma no *locus amyE*.....53

Figura 21: Teste de expressão da L-Asparaginase II de *A. fischeri* por *B. subtilis*. Observa-se os resultados dos extratos resultantes do rompimento celular das células obtidas nos cultivos das bactérias *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* $\Delta 6$ que possuem uma (KO7 1 e $\Delta 6$ 1), duas (KO7 2 e $\Delta 6$ 2) e quatro (KO7 4 e $\Delta 6$ 4) cópias do gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri* integradas ao seu genoma no *locus amyE*, além dos controles negativos (C-KO7 e C- $\Delta 6$) que consistem nas *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* $\Delta 6$ não transformadas com plasmídeos integrativos contendo o gene *ansB*.54

Figura 22: Digestão do pBS1C(A4481T) (mutação) pelas enzimas *EcoRI* e *BsaI*, utilizando como controle negativo o plasmídeo pBS1C não modificado. De acordo com a figura, o controle negativo apresentou os fragmentos esperados de 5.591bp e 1.583bp. Além disso, a presença de apenas um fragmento de 7.174bp resultante da digestão do plasmídeo mutado indica que este deixou de apresentar o sítio de reconhecimento da *BsaI* e, com isso, que a mutação sítio-dirigida funcionou.56

Figura 23: Digestão do pBS1C(A4481T)-Plux3.2-sfGFP (-ATG) pela enzima de restrição *BsaI*. É possível observar que o fragmento resultante da digestão apresenta 7.982bp referente ao plasmídeo digerido pela enzima indicando que o sítio da *BsaI* foi inserido o que significa que a clonagem funcionou.57

Figura 24: Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C(A4481T)-Plux3.2-sfGFP (-ATG) (Seq1) e a fornecida pelo sequenciador (Seq2) em duas regiões diferentes. A) Está representada a sequência indutora em rosa e o começo do Plux3.2 em roxo. B) É possível observar o final do Plux3.2 (roxo), os dois sítios de restrição da *BsaI* (vermelho) e o gene da GFP (verde).58

Figura 25: Alinhamento entre as sequências esperadas (Seq1) para o NucB e as fornecidas pelo sequenciamento (Seq2) dos plasmídeos resultantes da biblioteca de peptídeos-sinal. Em azul está representado o RBS, em vermelho o peptídeo-sinal e em verde o gene que codifica a GFP. O peptídeo-sinal identificado está indicado em cada alinhamento.60

Figura 26: Alinhamento entre as sequências esperadas (Seq1) para o PhoB, AmyE e WapA^w e as fornecidas pelo sequenciamento (Seq2) das sequências obtidas da biblioteca de peptídeos-sinal. Em azul está representado o RBS, em vermelho o peptídeo-sinal e em verde o gene que codifica a GFP. O peptídeo-sinal identificado está indicado em cada alinhamento.61

Figura 27: Fluorescência do sobrenadante (azul) e das células (laranja) dos cultivos de *B. subtilis* KO7 contendo cada peptídeo-sinal identificado e do controle negativo (*B. subtilis* KO7 não produtora de GFP). É possível observar que todos os cultivos das linhagens contendo peptídeo-sinal apresentaram sobrenadante com valor de fluorescência maior que o controle

negativo indicando a exportação da GFP. O peptídeo-sinal que resultou na exportação mais eficiente foi o PhoB (fluorescência do sobrenadante 1,65 vezes maior que o controle) 62

Figura 28: Fluorescência do sobrenadante (azul) e das células (laranja) dos cultivos de *B. subtilis* KO7 produzindo GFP fusionada a um peptídeo-sinal e do controle negativo (*B. subtilis* KO7 não produtora de GFP). De acordo com os resultados, é possível concluir que os peptídeos-sinal promoveram a exportação da GFP para o meio extracelular uma vez que os sobrenadantes dos cultivos das linhagens com peptídeo-sinal apresentaram fluorescência maior que o controle negativo. O sobrenadante do cultivo da linhagem Pep5 obteve o maior valor de fluorescência quando comparado com o controle (4,44 vezes). 64

Figura 29: Seq1 consiste na sequência esperada e Seq2 na fornecida pelo sequenciador. Em azul está representado o RBS, em vermelho a sequência do NucB e em verde o gene que codifica a GFP. O sequenciamento dos plasmídeos extraídos da Pep 1 a Pep15 forneceu as mesmas sequências as quais obtiveram o melhor alinhamento com o NucB..... 65

Figura 30: Alinhamento entre a sequência esperada para o LipA (Seq1) e a sequenciada a partir do DNA extraído da colônia Pep16 (Seq2). Em azul está o RBS, em vermelho a sequência do LipA e em verde o gene da GFP 66

Figura 31: Fluorescência das células e dos sobrenadantes após 12h (A) e 24h (B) de cultivo das linhagens obtidas a partir das duas bibliotecas de peptídeo-sinal construídas neste trabalho e do controle negativo (*B. subtilis* K07 não produtora de GFP). Em azul está representada a fluorescência do sobrenadante e em laranja a fluorescência das células..... 67

Figura 32: Colônias de *E.coli* JM109 transformadas com o plasmídeo pBSECK-RFP. A coloração rosa indica a presença da RFP..... 70

Figura 33: Fragmentos obtidos nas digestões com *EcoRI* e *PstI* para confirmar a presença do gene da RFP no plasmídeo pBSECK-RFP. Como esperado, a digestão do controle negativo resultou nos fragmentos de 3.243 bp, 1.119 bp e 208 bp e a do controle positivo apresentou os fragmentos de 6.068bp (plasmídeo digerido) e 1.106bp (gene que codifica a RFP). A digestão do plasmídeo extraído da *E. coli* JM109 resultante da transformação da reação do Golden Gate também resultou nos fragmentos de tamanho esperado (2.405 bp do plasmídeo digerido e 1.106 bp do gene da RFP). 71

Figura 34: Resultado da digestão pela *BsaI* dos plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* TOP10 (1 ao 4) transformadas com a ligação entre o pBSECK e o gene que codifica a L-Asparaginase II (sem o códon inicial). O controle negativo consistiu no plasmídeo pBSECK-RFP o qual não possui o sítio de reconhecimento da *BsaI*. A digestões dos plasmídeos 2 ao 4 resultaram no fragmento de tamanho esperado (4.634 bp) 72

Figura 35: Alinhamento entre a sequência esperada para o pBSECK-*ansB*(-ATG) (Seq1) e a fornecida pelo sequenciador (Seq2). Em azul está o RBS, em vermelho estão representados os dois sítios de reconhecimento da *Bsa*I e o gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri* está em rosa73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Grau de identidade entre as sequências de aminoácidos das L-Asparaginases bacterianas (em %). AnsB Ec corresponde à L-Asparaginase com atividade antileucêmica de <i>Escherichia coli</i> , AnsB Ew à mesma enzima oriunda de <i>Erwinia chrysanthemi</i> , AnsB Af à L-Asparaginase II de <i>Aliivibrio fischeri</i> e AnsA Ec é a L-Asparaginase sem atividade antileucêmica proveniente de <i>E. coli</i>	19
Tabela 2: Partes biológicas mais relevantes utilizadas no trabalho.....	22
Tabela 3: Teste do tempo ideal para a indução. A tabela apresenta os valores de proteínas totais, atividade e atividade específica da enzima sem a indução e 24 horas após diferentes tempos de indução (início e meio da fase exponencial).....	46
Tabela 4: Valores de proteínas totais, atividade e atividade específica resultantes dos ensaios com o extrato celular dos cultivos do controle negativo (<i>B. subtilis</i> $\Delta 6$ não produtora de L-Asparaginase II) e da bactéria <i>B. subtilis</i> $\Delta 6$ contendo duas cópias da unidade de transcrição do gene da L-Asparaginase II de <i>A. fischeri</i>	55

Lista de Símbolos

GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>A. fischeri</i>	<i>Aliivibrio fischeri</i>
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
bp	Par de bases (do inglês, <i>base pair</i>)
Kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
LB	Luria-Bertani
SOC	Meio de cultura líquido Super optimal suplementado com glicose
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
BSA	Albumina de Soro Bovino
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de Amônio
K₂HPO₄·3H₂O	Fosfato de Potássio Dibásico Trihidratado
KH₂PO₄	Fosfato Monopotássico
MgSO₄·3H₂O	Sulfato de Magnésio Trihidratado
EGTA	Ácido Egtazico
OD_{600nm}	Densidade Óptica a 600nm

Sumário

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
Lista de Figuras	5
1. Introdução.....	16
2. Objetivos	21
3. Materiais e métodos	21
3.1. Materiais	21
3.1.1. Materiais Biológicos	21
3.2. Clonagem e Expressão do gene da L-Asparaginase II de <i>A. fischeri</i> em <i>B. subtilis</i> . ..	23
3.3. Integração do gene da L-Asparaginase II no genoma da <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.4. Construção do sistema de exportação de proteínas por <i>B. subtilis</i>	33
4. Resultados e Discussão.....	41
4.1. Confirmação da clonagem e expressão do gene da L-Asparaginase II de <i>Aliivibrio fischeri</i> em <i>Bacillus subtilis</i>	41
4.2. Integração do gene da L-Asparaginase II no genoma da <i>B. subtilis</i>	47
4.3. Sistema de exportação de proteínas por <i>B. subtilis</i>	55
5. Conclusões.....	73
6. Referências bibliográficas.....	74
APÊNDICES	80

1. Introdução

Durante muitos anos, antes do surgimento da tecnologia do DNA recombinante, a obtenção de biomoléculas terapêuticas dependia do cultivo de animais (extração de enzimas e outras biomoléculas, como a insulina) e patógenos (produção de vacinas). O desenvolvimento desta tecnologia permitiu a produção de proteínas heterólogas por células eucariotas ou procariotas geneticamente modificadas, o que tornou o processo de produção muito mais rápido e seguro.

Um dos microrganismos mais utilizados neste processo é a *Escherichia coli*. Além de apresentar rápido crescimento, esta bactéria é capaz de produzir grandes quantidades de proteínas, o que a tornou prioritária no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Entretanto, a produção de endotoxinas, somada a falta de capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular são responsáveis por encarecer a produção de proteínas heterólogas pela *E. coli*. (TRIPATHI, 2016).

O problema é ainda maior quando se trata de produtos usados em alto grau de pureza, como biofármacos. Microrganismos classificados como seguros (*GRAS* - *Generally Recognized as Safe*) podem servir como melhores plataformas para a produção destas moléculas, principalmente se forem capazes de exportar a proteína terapêutica para meio extracelular. Com isso, uma alternativa a produção de biofármacos por *E. coli* é a produção destas biomoléculas por *Bacillus subtilis*. Esta é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, classificada como *GRAS*, capaz de secretar proteínas diretamente no meio de cultura, além de ser de fácil manipulação genética e facilmente adaptável à produção em larga escala. (LIU, *et al.*, 2019).

Considerando o amplo crescimento do mercado de biofármacos (estima-se que o mercado de enzimas terapêuticas alcance o valor de \$6,3 bilhões de dólares em 2021) este projeto propõe a elaboração de uma plataforma padronizada de produção de biofármacos utilizando a bactéria *Bacillus subtilis* como chassis. Esta plataforma permitirá a produção de diferentes biomoléculas terapêuticas apenas pela troca do gene codificador da mesma, eliminando grande parte dos testes necessários para cada nova linhagem produtora. (CHAND, *et al.*, 2020).

Biofármacos

Biofármacos são moléculas estruturalmente complexas, de alto peso molecular, produzidas por organismos vivos e aplicadas como medicamentos no tratamento de diversas doenças. Os biofármacos podem ser proteínas, medicamentos relacionados ao

sistema imunológico, como soros e vacinas, além de medicamentos de terapia gênica. (DECLERCK, 2012; FERRAZ, *et al.*, 2018). A complexidade e o peso molecular dos biofármacos se assemelha à de proteínas. (FERRAZ, *et al.*, 2018). Entre as vantagens dos biofármacos em relação às drogas sintéticas, estão as suas altas especificidade e atividade o que evita a ocorrência de efeitos indesejáveis no organismo dos pacientes que recebem o tratamento com estas biomoléculas. (KESIK-BRODACKA, 2018).

A escolha do organismo que produzirá os biofármacos é altamente dependente da sua conformação final. Com isso, um dos principais fatores que definem o organismo produtor são as modificações pós-traducionais, como a formação de pontes dissulfeto e a glicosilação. Estas modificações desempenham um papel essencial na conformação e atividade de proteínas. Bactérias não são capazes de realizar estes tipos de modificação, ao contrário de leveduras as quais possuem esta habilidade, porém limitada quando comparadas a células de mamíferos. (PARKER, *et al.*, 2021). Além disso, é desejável que o organismo produtor seja de fácil manipulação genética e requeira um meio de cultivo simples e barato, além de apresentar rápido crescimento e gerar altos rendimentos de produção. (PUETZ, *et al.*, 2019; WELLS, *et al.*, 2017).

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-Positiva, não patogênica que não produz endotoxinas e nem exotoxinas. Esta bactéria requer um meio simples para seu crescimento e já foi utilizada para a superprodução de diversas moléculas de alto valor. Além disso, *B. subtilis* é capaz de exportar proteínas nativas e heterólogas para o meio extracelular através dos sistemas Sec e Tat bastando apenas a presença de um peptídeo-sinal. (CUI, *et al.*, 2018). A presença de apenas uma membrana facilita o processo de exportação proteica por esta bactéria. (PHAN, *et al.*, 2012). Outra vantagem de utilizar a *B. subtilis* em produção de proteínas heterólogas é a ausência de viés de códons. (PHAN, *et al.*, 2012). Portanto, neste trabalho a produção de L-Asparaginase II de *A. fischeri* foi realizada aplicando a *B. subtilis* como linhagem hospedeira.

L-Asparaginase

Para a construção da plataforma bacteriana de produção de biofármacos a proteína utilizada como modelo foi a L-Asparaginase II a qual é aplicada no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Este tipo de leucemia consiste na diferenciação e proliferação anormais de células da medula óssea que irão dar origem às células linfóides.

Apesar de ser a segunda leucemia mais comum em adultos, 80% dos casos de LLA ocorre em crianças e os sintomas mais comuns são perda de peso, suor noturno, febre, sangramentos e fadiga. O tratamento para LLA se mostrou bastante efetivo para crianças, entretanto entre 30 e 40% dos adultos portadores de LLA apresentam remissão. (TERWILLIGER, *et al.*, 2017).

A L-Asparaginase é capaz de catalisar a hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia. Com isso, diminui a concentração deste aminoácido no plasma sanguíneo, impedindo a proliferação das células cancerígenas as quais não são capazes de produzi-lo devido a um silenciamento gênico que impede a síntese da enzima Asparagina Sintetase. Quando aplicado em crianças portadoras deste tipo de câncer, o tratamento com L-Asparaginase apresenta uma probabilidade de cura igual a 90%. (SALZER, *et al.*, 2018).

Além disto, a L-Asparaginase pode ser utilizada para impedir a formação de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas. A acrilamida é um composto que possui efeito carcinogênico em humanos (RAY, *et al.*, 2019). Dessa forma, esta enzima apresenta grande importância para a indústria de biofármacos e alimentícia.

Atualmente, as L-Asparaginases antileucêmicas disponíveis no mercado são codificadas por genes de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* e sua estruturalmente caracterizadas como homo tetrâmeros (CASTRO, *et al.*, 2021). Inicialmente, o paciente é tratado com a enzima L-Asparaginase II de *E. coli*. Entretanto, alguns efeitos adversos podem ser gerados no organismo destes pacientes como a hipersensibilidade a L-Asparaginase a qual consiste na produção de anticorpos antiasparaginase e redução na atividade enzimática. A hipersensibilidade clínica é caracterizada por edemas, urticária, anafilaxia, prurido e erupção cutânea e ocorre entre 10 e 30% dos indivíduos tratados com a enzima oriunda de *E. coli*. (HIJIYA, *et al.*, 2016; NGUYEN, *et al.*, 2016).

Como alternativa, estes indivíduos passam a ser tratados com a PEG-Asparaginase que também é proveniente de *E.coli*. Se os efeitos persistem (são observados em 3 a 24% dos pacientes que recebem a PEG-Asparaginase), esta é substituída pela L-Asparaginase de *E. chrysanthemi* a qual pode desencadear os mesmos efeitos adversos entre 3 e 37% dos pacientes. (HIJIYA, *et al.*, 2016; NGUYEN, *et al.*, 2016).

Somando a isto, o Brasil enfrenta dificuldades no abastecimento de L-Asparaginase. Este biofármaco deve ser obtido através de importação uma vez que o país não possui produção própria desta enzima. Ademais, os problemas envolvem a

recomendação do Ministério Público Federal, com apoio do Conselho Federal de Medicina (CFM) e da Associação Médica Brasileira (AMB), da proibição da obtenção da enzima produzida pela empresa chinesa Beijing SL Pharmaceutical e importada pelo Brasil, devido às suspeitas de falta de segurança e eficácia do produto (AMB, 2017).

Com isso, é de extrema importância que o Brasil passe a ser autossuficiente em L-Asparaginase, com produção nacional. Pesquisadores da FIOCRUZ e da Universidade de São Paulo (USP) estão desenvolvendo uma *E. coli* produtora desta enzima codificada pelo gene oriundo de *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, as pesquisas ainda não alcançaram as etapas de estudos necessárias para registro e comercialização do produto. (COSTA, 2016, PIÑERO, 2018, AMB, 2021).

Neste trabalho, o gene que codifica a L-Asparaginase aplicada como modelo de biofármaco é proveniente da bactéria Gram-negativa *Aliivibrio fischeri*. Assim como a *E. coli*, esta bactéria apresenta em seu genoma as sequências de dois tipos de L-Asparaginase, entretanto esta enzima nunca foi produzida e caracterizada. Uma delas é a L-Asparaginase I, codificada pelo gene *ansA*, a qual é citoplasmática e possui baixa afinidade pelo substrato L-Asparagina. Enquanto a L-Asparaginase II, codificada pelo gene *ansB* e periplasmática, tem alta afinidade pelo mesmo substrato e, com isso, alto potencial para ser aplicada no tratamento de leucemias (KRISHNAPURA, *et al.*, 2016).

A Tabela 1 compara a identidade entre a sequência de aminoácidos das L-Asparaginases antileucêmicas comerciais provenientes de *E. coli* (AnsB Ec) e *E. chrysanthemi* (AnsB Ew) com a sequência da L-Asparaginase de *A. fischeri* (AnsB Af) e da L-Asparaginase I de *E. coli* sem atividade antileucêmica (AnsA Ec).

Tabela 1: Grau de identidade entre as sequências de aminoácidos das L-Asparaginases bacterianas (em %). AnsB Ec corresponde à L-Asparaginase com atividade antileucêmica de *Escherichia coli*, AnsB Ew à mesma enzima oriunda de *Erwinia chrysanthemi*, AnsB Af à L-Asparaginase II de *Aliivibrio fischeri* e AnsA Ec é a L-Asparaginase sem atividade antileucêmica proveniente de *E. coli*.

	AnsB Ec	AnsB Af	AnsB Ew	AnsA Ec	
AnsB Ec	100				Ec
AnsB Af	70,9	100			Ew
AnsB Ew	44,6	49,4	100		Af
AnsA Ec	9,9	11,7	5,5	100	AnsB
					AnsA

Ec	Escherichia coli
Ew	Erwinia chrysanthemi
Af	Aliivibrio fischeri
AnsB	Anti-leucêmica (tipo II)
AnsA	não Anti-leucêmica (tipo I)

Fonte: Autora (2019).

Como demonstrado na tabela, AnsB de *A. fischeri* possui alta identidade em relação a AnsB de *E. coli* (70,9%) e de *E. chrysanthemi* (49,9%) e baixa identidade com AnsA de *E. coli* (11,7%), indicando alto potencial para atividade antileucêmica. Ainda assim, a L-Asparaginase II de *A. fischeri* apresenta algumas divergências em sequência de aminoácidos quando comparada com as enzimas comerciais, indicando a possibilidade de diferenças nas características relacionadas à catálise, estabilidade e imunogenicidade, o que pode ser esclarecido através da caracterização da enzima.

Exportação de proteínas

A exportação de proteínas para o meio extracelular é de grande interesse para a produção industrial de biofármacos, pois elimina a etapa de rompimento celular, facilitando a purificação do produto e tornando o processo menos custoso. Para que seja secretada para fora da célula, a proteína deve ser sintetizada com um sinalizador denominado peptídeo-sinal. O peptídeo-sinal é uma sequência pequena de aminoácidos que é removida por enzimas denominadas Peptidases Sinal (SPases) após a exportação da proteína e o degradada por Peptidases de Peptídeo-sinal (SPPases).

As duas vias mais comuns de exportação proteica em bactérias são a Sec e a Tat. As proteínas exportadas pela via Sec (principal via de secreção por bactérias) atingem sua conformação final após o transporte, o qual pode ser simultâneo à tradução ou pós-traducional. Enquanto a via Tat (do inglês, *Twin-Arginine Translocation*) é caracterizada pela secreção de proteínas já na sua conformação ativa. Os peptídeos-sinal pertencentes à via Sec são compostos por uma extremidade amino-terminal carregada positivamente (N), uma região central hidrofóbica (H) e a extremidade carboxi terminal polar (C) a qual carrega o sítio de reconhecimento da PSase. Alterações nestes três domínios podem alterar a eficiência da exportação da proteína. Os peptídeos-sinal que sinalizam a exportação proteica pela via Tat possuem os mesmos domínios, porém com algumas diferenças, como a presença de uma sequência consenso de aminoácidos entre as regiões N e H (S/T-R-R-X-F-L-K, sendo X um aminoácido polar). Além disso, a região H é menos hidrofóbica que a dos peptídeos-sinal da Sec e os aminoácidos da região C não são comumente encontrados na mesma região dos peptídeos desta via. Estas diferenças são importantes para garantir a especificidade dos dois sistemas de transporte proteico. Neste trabalho, foram testados 5 peptídeos-sinal da via Sec e 3 pertencentes à Tat. (FREUDL, 2018, TJALSMA, *et al.*, 2000)

2. Objetivos

O projeto tem como objetivo a construção de uma plataforma bacteriana padronizada para a produção heteróloga de proteínas terapêuticas. A proteína utilizada como modelo foi a L-Asparaginase II de *Aliivibrio fischeri*, e o chassis escolhido foi a bactéria *Bacillus subtilis* (*Generally Recognized as Safe*).

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

A enzima de restrição *Bsa*I utilizada neste trabalho foi a *Bsa*I-HF®v2 (New England Biolabs, NEB). As demais enzimas de restrição são *FastDigest* e da marca Thermo Fisher Scientific™. A T4 DNA Ligase, a *Dpn*I e a Fosfatase Alcalina Termosensível (*FastAP*) também foram obtidas da Thermo Fisher Scientific™. A *Hind*III foi comprada da New England BioLabs (NEB). A DNA polimerase aplicada na Reação em Cadeia da Polimerase foi a TIME ECRA HIFI DNA Polimerase (ECRA Biotec™), enquanto na reação de PCR de colônia para confirmação da integração do gene *ansB* no genoma da *Bacillus subtilis* foi utilizada a Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific™). Todas as reações de PCR ocorreram no termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

Os kits de purificação de PCR e reações de digestão usados foram o GeneClean® turbo kit (MR Biomedicals™) e Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e a extração de DNA plasmidial foi realizada com kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega). O DNA genômico foi extraído com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit. A quantificação de ácidos nucleicos e a medida de fluorescência e densidade ótica (para o teste de exportação) foram feitas em leitor de placas Tecan Infinite 200 Pro (Tecan™). Para o sequenciamento, foram utilizados o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific™) e o BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific™). Além disso, neste trabalho, as simulações e análises *in silico* foram realizadas nos softwares SerialCloner 2.6.1 e Benchling.

3.1.1. Materiais Biológicos

Os plasmídeos foram propagados em *Escherichia coli* TOP10 e JM109 disponíveis na coleção de culturas do laboratório e então inseridos em *Bacillus subtilis*. A bactéria *Bacillus subtilis* Δ6 (GenBank CP015975) foi utilizada como hospedeira para

a produção heteróloga da L-Asparaginase II de *A. fischeri*. Esta bactéria foi criada a partir da *B. subtilis* 168 que teve genes não essenciais deletados do seu genoma, o que faz com que o consumo de substrato pelo microrganismo seja direcionado para a produção de moléculas essenciais e do produto desejado, além de diminuir a produção de contaminantes, favorecendo o processo de purificação (MORIMOTO, *et al.*, 2008; REUß, *et al.*, 2016). Além disso, o sistema de exportação de proteínas foi criado utilizando a *Bacillus subtilis* K07 a qual também foi aplicada para testar a produção de L-Asparaginase II de *A. fischeri* a partir da integração no genoma da bactéria do gene que codifica a enzima. A *Bacillus subtilis* K07 (BGSCID 1A1133) consiste em uma linhagem que não produz proteases extracelulares. A tabela abaixo demonstra a descrição das partes biológicas mais relevantes deste trabalho.

Tabela 2: Partes biológicas mais relevantes utilizadas no trabalho.

Sequência	Identificação	Descrição	Referência
pBS0EXylRPxylA	BBa_ECE743	Plasmídeo replicativo em <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> . Fornece resistência a ampicilina em <i>E. coli</i> e eritromicina em <i>B. subtilis</i> . Contém o promotor induzível por xilose PxylA	POPP <i>et al.</i> , 2017
pBS1K	BBa_ECE731	Plasmídeo replicativo em <i>E. coli</i> que integra no genoma da <i>B. subtilis</i> no locus <i>amyE</i> . Fornece resistência a ampicilina em <i>E. coli</i> e canamicina em <i>B. subtilis</i>	POPP <i>et al.</i> , 2017
pBS1C(A4481T)	-	Mutação a partir do pBS1C (BBa_ECE257). Replicativo em <i>E. coli</i> e integrativo em <i>B. subtilis</i> (locus <i>amyE</i>). Fornece resistência a ampicilina em <i>E. coli</i> e cloranfenicol em <i>B. subtilis</i>	RADECK <i>et al.</i> , 2013
Proteína Verde Fluorescente (GFP, do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>)	BBa_E0040	Gene que codifica a Proteína Verde Fluorescente isolado e amplificado a partir do plasmídeo pDR111_GFP(Sp)(BGSCID ECE278) presente na coleção de culturas do laboratório	Overkamp <i>et al.</i> , 2013
Proteína Vermelha Fluorescente (RFP, do inglês,	BBa_E1010	Gene que codifica a Proteína Vermelha Fluorescente isolado e amplificado a partir do plasmídeo pBS1C	RADECK <i>et al.</i> , 2013

Red <i>Fluorescent Protein</i>)		(BBa_ECE257) presente na coleção de culturas do laboratório	
RBS R0	-	Sítio de Ligação do Ribossomo de <i>B. subtilis</i>	GUIZIOU <i>et al.</i> , 2016
<i>ansB</i>	GeneID: 3278692	Gene que codifica a L- Asparaginase II de <i>A. fischeri</i> , amplificado a partir do genoma da bactéria NC_006840	-
AnsB Af	WP_011262105.1	Sequência de aminoácidos da L- Asparaginase II de <i>A. fischeri</i>	-
AnsB Ec	WP_000394140.1	Sequência de aminoácidos da L- Asparaginase II de <i>E. coli</i>	-
AnsB Ew	UniProtKB/Swiss-Prot: P06608.1	Sequência de aminoácidos da L- Asparaginase II de <i>E. chrysanthemi</i>	-
Pveg	BBa_K143012	Promotor constitutivo de <i>B. subtilis</i>	GUIZIOU <i>et al.</i> , 2016
Plux 3.2	-	Promotor sintético constitutivo de <i>B. subtilis</i> construído e otimizado por uma aluna de doutorado do grupo de pesquisa	CORRÊA, <i>et al.</i> , 2020
PxylA	BBa_K733002	Promotor induzível por xilose de <i>B. subtilis</i>	POPP <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Autora (2021).

3.2. Clonagem e Expressão do gene da L-Asparaginase II de *A. fischeri* em *B. subtilis*.

A primeira etapa deste trabalho consistiu na construção de um sistema de expressão do gene da L-Asparaginase II (*ansB*) de *Aliivibrio fischeri* em *B. subtilis* $\Delta 6$ (GenBank CP015975, REUß *et al.*, 2016). Para isto, o gene foi isolado e amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase a partir do genoma da bactéria *A. fischeri*.

Na PCR, o primer *forward* adicionou os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *XbaI* (*Biobrick* prefixo), assim como o Sítio de Ligação do Ribossomo (RBS) R0 de *B. subtilis*. (GUIZIOU *et al.*, 2016). O primer *reverse* adicionou os sítios das enzimas *PstI* e *SpeI* (*Biobrick* sufixo). A reação consistiu em 10,0µL de Tampão HIFI 5x, 1,0µL de dNTPs 10,0mM, 2,5µL do primer *forward* 10,0µM, 2,5µL do primer *reverse* 10,0µM, DNA molde (400,0ng do DNA genômico), 0,5µL da TIME HIFI DNA Polimerase (1U para 50,0 µL de reação) e água ultrapura para completar os 50,0µL totais de reação.

O programa aplicado no termociclador foi o seguinte: desnaturação inicial - 98°C por 30s, desnaturação - 98°C por 10s, anelamento - 53°C por 30s, extensão - 72°C por

1min30s (30s por kilobase), extensão final – 72°C por 10min e *Hold* – 4°C por tempo indeterminado. As etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidas por 35 ciclos. A PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), a 110 volts durante 40 minutos, e então purificada, sendo o DNA quantificado em leitor de placas. Neste trabalho, todos os géis foram revelados no equipamento Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad) e o marcador de massa molecular utilizado foi o GeneRuler 1,0kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

O vetor utilizado foi o plasmídeo pBS0EXylR-PxylA replicativo em *B. subtilis* (sendo o plasmídeo resultante da clonagem denominado pBS0EXylR-PxylA-*ansB*). Portanto, a expressão do gene é controlada pelo promotor P_{xylA}, o qual é induzível por xilose. A escolha do promotor induzível teve como objetivo evitar que o crescimento da bactéria fosse prejudicado pela hidrólise de L-Asparagina. (POPP *et al.*, 2017).

Foram utilizados os métodos clássicos de clonagem, na qual o vetor plasmidial e o inserto foram digeridos pelas enzimas de restrição do *Biobrick* prefixo e sufixo, *EcoRI* e *PstI* respectivamente. Seguindo o protocolo do fabricante, em cada reação de digestão, foi adicionado 800,0ng de DNA, 1,0μL de cada enzima de restrição, 4,0μL do tampão *FastDigestBuffer* 10x e água ultrapura para completar o volume de 40,0μL (o volume total de enzimas de restrição não deve ser maior que 10% do volume total de reação). Na digestão do plasmídeo, além das enzimas do *Biobrick*, foi adicionada a *FastAP* a qual desfosforila o DNA, impedindo que o mesmo religue com a sequência removida pelas enzimas de restrição. Na digestão do inserto, o qual foi produto da Reação em Cadeia da Polimerase do DNA genômico da *A. fischeri*, além da *EcoRI* e *PstI*, foi adicionada a enzima *DpnI*, com o intuito de degradar o DNA utilizado como molde na PCR. As reações foram incubadas durante 1 hora a 37°C e então foram purificadas, sendo o DNA quantificado em leitor de placas.

A ligação entre o plasmídeo e o inserto foi realizada na proporção 1:5, respectivamente, e a quantidade do inserto necessária para a reação foi fornecida pelo site *Ligation Calculator Insilico* (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html). A reação consistiu em 1,0μL do tampão 10x T4 Buffer, 50,0ng do plasmídeo digerido, 38,4ng do inserto digerido (segundo a proporção), 0,5μL da T4 DNA Ligase, e água ultrapura para completar os 10,0μL de reação. O controle da ligação foi composto pelos mesmos componentes exceto o inserto. As reações foram incubadas a 22°C durante 2 horas.

O plasmídeo resultante da ligação entre as sequências foi inserido em *Escherichia coli* TOP10 quimicamente competente. Para a produção de células de *E. coli* TOP10 quimicamente competentes, as bactérias foram inoculadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (10,0g/L de triptona, 5,0g/L de extrato de levedura e 10,0g/L de NaCl, pH 7,0) a uma densidade óptica a 600nm (OD₆₀₀) entre 0,03-0,05 e incubadas a 37°C e 220rpm até atingir a OD₆₀₀ entre 0,3-0,4. Posteriormente, as células foram transferidas para 2 tubos Falcon de 50,0mL, previamente resfriados em gelo, e centrifugadas durante 10 min a 5.000xg e 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20,0mL de CaCl₂ 0,1M também resfriado em gelo. As células foram mantidas no gelo durante 20 minutos, centrifugadas por 10 min a 5.000xg a 4°C, ressuspensas em 2,0mL de CaCl₂ 0,1M/ 10% glicerol, aliquotadas e armazenadas em ultra freezer a -80°C.

Para a transformação, adicionou-se 50,0μL das células competentes aos 10,0μL resultantes da ligação. As células, com o DNA, foram incubadas em gelo por 30 minutos, posteriormente colocadas em banho-maria a 42°C durante 30 segundos e então transferidas, imediatamente, para o gelo onde permaneceram por 2 minutos. Após este período, foi adicionado 250,0μL do meio SOC (triptona 20,0g/L, extrato de levedura 5,0g/L, cloreto de sódio 0,584g/L, cloreto de potássio 0,186g/L, sulfato de magnésio 2,4g/L, e glicose 0,4% (v/v) pH 7,5) e as células foram incubadas em mesa agitadora, por 1 hora, a 37°C e 220rpm. As bactérias resultantes da transformação foram plaqueadas em meio LB suplementado com o antibiótico ao qual o plasmídeo as torna resistentes (ampicilina 100μg/mL). As placas permaneceram em estufa bacteriológica a 37°C durante 12 horas.

Após as 12 horas de incubação, as colônias que cresceram nas placas da transformação foram coletadas, inoculadas em LB líquido com ampicilina 100μg/mL e incubadas a 37°C e 220rpm durante 12 horas. Os plasmídeos contidos em cada colônia foram extraídos e quantificados em leitor de placas. Para a confirmação da clonagem, foi realizada a digestão dos plasmídeos pelas enzimas *EcoRI* e *PstI*, seguida pela corrida do produto da digestão em gel de agarose 1% (m/v), a 110 volts durante 40 minutos. A colônia que apresentou os fragmentos referentes ao plasmídeo contendo o gene da L-Asparaginase II de *A. fischeri* foi sequenciada.

Os componentes da reação de PCR para o preparo das amostras para o sequenciamento foram: 1,0μL do BigDye™ Terminator v3.1 Mix, 3,5μL do tampão BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, 2,0μL do primer *forward* ou *reverse* 3,2μM (um primer por reação), DNA molde (200,0ng – 500,0ng) e água ultrapura

para completar os 20,0µL totais da reação. O programa utilizado no termociclador foi: desnaturação inicial - 96°C por 1 min, desnaturação – 96°C por 10s, anelamento – 55°C por 50s, extensão – 60°C por 4min – extensão final – 60°C por 5min - 4°C por tempo indeterminado. Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 30 vezes.

Posteriormente, foi realizada a purificação das amostras resultantes da reação de PCR para o sequenciamento. A primeira etapa da purificação consistiu na adição de 45,0µL da solução SAM™ seguida pela adição de 10,0µL da solução XTerminator™. A mistura foi agitada em um banho seco com agitação (Fisher Scientific™) durante 30 minutos e então centrifugada durante 20 segundos. Em seguida, 20,0µL do sobrenadante resultante do processo foram pipetados em placa de 96 poços e levados ao sequenciador.

Com isso, a colônia que continha o plasmídeo positivo (pBS0EXylR-PxylA-ansB) foi estocada em glicerol 20% e mantida em ultra freezer a -80°C. Além disso, o plasmídeo foi inserido em *Bacillus subtilis* Δ6.

Para a produção de *B. subtilis* competente, as células foram inoculadas em 20,0mL de meio SpC (20,0mL de T Base ((NH₄)₂SO₄ 2,0g/L, K₂HPO₄·3H₂O 18,3g/L, KH₂PO₄ 6,0g/L, citrato de sódio·2H₂O 1,0g/L), 0,2mL de glicose 50% (m/v), 0,3mL de MgSO₄·3H₂O 1,3% (m/v), 0,4mL de extrato de levedura 10% (m/v), 0,5mL de casaminoácidos 1% (m/v) e triptofano 20µg/mL) a uma OD₆₀₀ de 0,5 e incubadas a 37°C e 220rpm até atingir a fase estacionária. Posteriormente, 2,0mL da cultura foram inoculados em 200,0mL meio SpII (200,0mL de T Base, 2,0mL de glicose 50% (m/v), 14,0mL de MgSO₄·3H₂O 1,3% (m/v), 2,0mL de extrato de levedura 10% (m/v), 2,0mL de casaminoácidos 1% (m/v), 1,0mL de CaCl₂ 0,1M e triptofano 20µg/mL) pré-aquecido e incubados a 37°C e 180rpm (menor aeração) durante 90 minutos. Após este período, as células foram transferidas para tubos Falcon e centrifugadas a 8.000xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um recipiente estéril. As células foram ressuspensas em 18,0mL do sobrenadante mais 3,5mL de glicerol 60% e então foram aliquotadas e armazenadas em ultra freezer a -80°C.

Durante a etapa de transformação, foi adicionado 500,0ng do plasmídeo a 250,0µL de células de *B. subtilis* Δ6 competentes previamente descongeladas em banho-maria a 37°C, e 250,0µL de meio SpII+EGTA (200,0mL de SpII sem o CaCl₂ e 4,0mL de EGTA 0,1M e pH 8,0). As células, com o DNA e o meio SpII+EGTA, foram incubadas durante 1 hora a 37°C e 220rpm.

A confirmação da transformação em *B. subtilis* $\Delta 6$ foi realizada pela digestão do plasmídeo extraído das colônias resultantes do processo (após as células terem sido incubadas durante 1 hora a 37°C com lisozima afim de romper a parede celular da bactéria) pela enzima de restrição *Hind*III. A digestão pela *Hind*III foi escolhida como método de confirmação da clonagem uma vez que esta digere o molde em três locais diferentes enquanto o plasmídeo com o gene da L-Asparaginase II apresenta apenas um sítio de reconhecimento desta enzima. A reação consistiu em 1,0 μ L do tampão NEBuffer™ 2.1, 600,0ng do plasmídeo, 0,5 μ L de *Hind*II e água ultrapura para completar o volume total de 10,0 μ L. O resultado da digestão foi analisado após a corrida do produto da reação em gel de agarose 1% (m/v), a 110 volts durante 40 minutos.

Com isso, foi construída uma curva de crescimento da bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ transformada com o plasmídeo pBS0EXylR-PxylA-*ansB* e do controle negativo (*B. subtilis* $\Delta 6$ não transformada). Para isto, as bactérias foram cultivadas em LB líquido a 37°C e 220rpm. O meio de cultivo da bactéria transformada foi suplementado com eritromicina 1,0 μ g/mL e do controle negativo com cloranfenicol 5,0 μ g/mL (esta bactéria apresenta o gene de resistência a cloranfenicol em seu genoma). A adição do antibiótico ao cultivo do controle negativo teve como objetivo evitar o crescimento de contaminações. A absorbância dos cultivos foi medida em espectrofotômetro (600nm) a cada 30 minutos. Dessa forma, foi possível identificar a fase exponencial do crescimento da bactéria e, com isso, foram testados diferentes tempos de indução, no início ($OD_{600nm} = 0,7$, após 2h30min de cultivo), no meio ($OD_{600nm} = 1,0$, após 3h30min de cultivo) e no final ($OD_{600nm} = 1,5$, após 4h30min de cultivo) da fase exponencial. Além destes, foi realizado um cultivo sem indução o qual teve a mesma duração que os demais cultivos. Com isso, foi determinada a OD_{600nm} ótima para a indução.

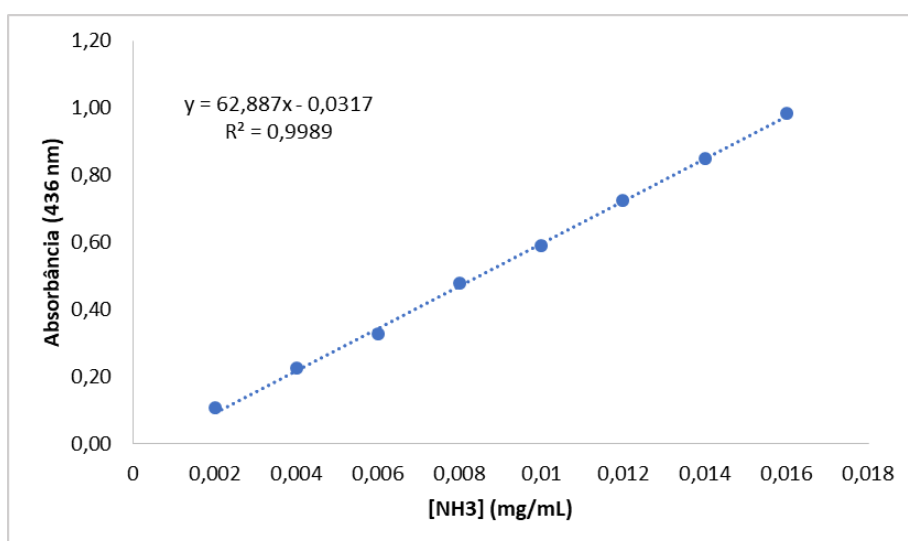
Até a bactéria atingir esta OD_{600nm} , para indução a temperatura de incubação foi mantida em 37°C e a velocidade de rotação foi 220rpm. Após a indução, estes parâmetros foram alterados para 30°C e 200rpm. O cultivo foi interrompido 24 horas após a adição da xilose e as células foram centrifugadas (10.600xg por 10min) e ressuspensas em tampão PBS pH 8.0. Em seguida, as células foram rompidas por sonicação (potência 45%, 15 ciclos de 2 minutos). O produto do rompimento foi centrifugado (10.600xg por 10min) e o sobrenadante foi armazenado para ser testado quanto à presença e atividade da L-Asparaginase II.

O teste de expressão da L-Asparaginase II pela *B. subtilis* $\Delta 6$ foi realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do produto do rompimento celular do

cultivo da bactéria, antes da indução e 4 horas após a indução da expressão do gene por xilose 0,5% (POPP *et al.*, 2017). O peso molecular esperado para uma subunidade da L-Asparaginase II de *A. fischeri* é de 37,5KDa (ProtParam-<https://web.expasy.org/protparam/>) e o controle da corrida foi o produto do cultivo e rompimento da *B. subtilis* Δ6 não produtora de L-Asparaginase II.

A atividade da enzima foi determinada pela metodologia de Nessler, na qual é realizada uma correlação entre a quantidade de amônia liberada na hidrólise do aminoácido L-Asparagina e a atividade da L-Asparaginase. Para isto, 0,05mL dos extratos celulares foram incubados com uma solução de 189mM de L-Asparagina e 0,5mL do tampão TRIS-HCl (50mM e pH 8,6), a 37°C durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,25mL Ácido Tricloroacético (TCA) 1,5mol/L o qual precipita a enzima, assim como as demais proteínas. Após a remoção das proteínas por centrifugação, a amônia liberada pela reação de hidrólise do substrato foi quantificada pela adição do reagente Nessler em uma reação contendo 0,25mL deste reagente, 0,5mL de água destilada e 0,5mL do produto da reação enzimática. A quantificação da amônia foi realizada através da medida de absorbância a 436nm e teve como base a curva padrão construída com diferentes concentrações de sulfato de amônio. (MAGRI, *et al.*, 2018). A curva padrão, assim como a equação está na Figura 1:

Figura 1: Curva padrão para quantificar a amônia liberada na reação de hidrólise de L-Asparagina e, com isso, determinar a atividade da L-Asparaginase II. Na equação, y corresponde à absorbância a 436nm e x à concentração de amônia (mg/mL).



Fonte: Autora em colaboração com o profissional de Pós-doutorado Heitor Bento (2021).

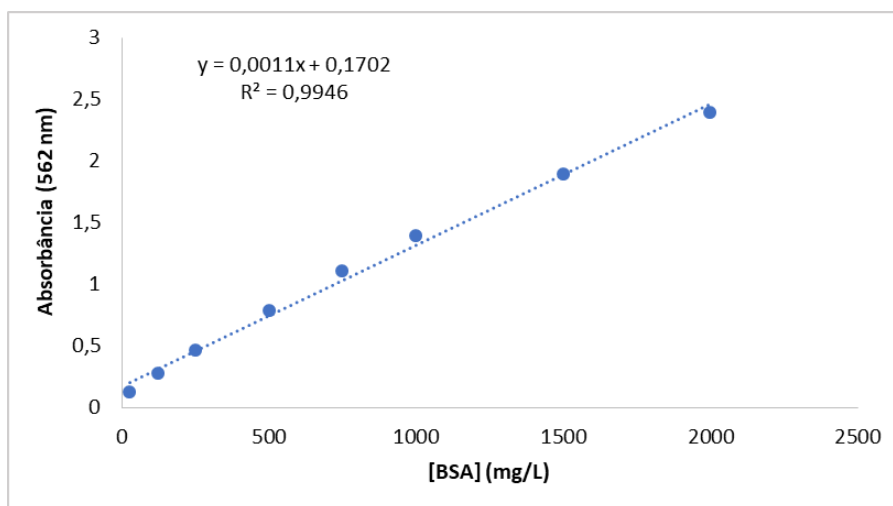
A partir da concentração de amônia, a atividade da L-Asparaginase II (U/mL) é determinada através da seguinte equação:

$$\text{Atividade(U/mL)} = \frac{[\text{NH}_3](\mu\text{mol/mL}) * V_R(\text{mL}) * V_{\text{Nessler}}(\text{mL})}{V_t(\text{mL}) * t_R(\text{min}) * V_E(\text{mL})} \quad \text{Equação 2}$$

Nesta equação, $[\text{NH}_3]$ é a concentração de amônia ($\mu\text{mol/mL}$) determinada por Nessler, V_R é o volume da reação enzimática (mL), V_{Nessler} é o volume da reação com o reagente Nessler (mL), V_t é o volume da reação enzimática adicionado ao tubo onde ocorre a reação com o Nessler (mL), t_R é o tempo da reação de hidrólise (min) e V_E é o volume de L-Asparaginase II adicionado à reação enzimática (mL).

A quantificação de proteínas foi realizada com o Pierce™ BCA Protein Assay KitA (Thermo Fisher Scientific™), no qual a concentração proteica foi medida através da absorbância a 562nm, seguindo a curva padrão feita com diferentes concentrações de Albumina de Soro Bovino (BSA). (Figura 2).

Figura 2: Curva padrão para quantificação de proteínas totais. Na equação, y refere-se à absorbância a 562nm e x à concentração de proteínas (mg/mL).



Fonte: Aluna (2021).

Com isso, a atividade específica da L-Asparaginase II de *A. fischeri* produzida por *B. subtilis* Δ6 foi determinada por meio da divisão da atividade da enzima pela quantidade de proteínas totais no meio fermentado (Equação 2).

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{\text{Atividade (U/mL)}}{\text{Quantidade de proteínas (mg/mL)}} \quad \text{Equação 2}$$

3.3. Integração do gene da L-Asparaginase II no genoma da *Bacillus subtilis*.

Uma segunda abordagem do projeto foi aplicada. Nesta, foram desenvolvidas linhagens de *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7 contendo o gene que codifica a L-Asparaginase II de *Aliivibrio fischeri* integrado ao seu genoma no *locus amyE*, sob controle do promotor constitutivo P_{veg} , o qual se demonstrou um promotor forte para *B. subtilis* (GUIZIOU *et al.*, 2016). O plasmídeo utilizado foi o pBS1K (POPP, *et al.*, 2017) ao qual não foi adicionado um peptídeo-sinal, portanto a enzima não é exportada para o meio extracelular. Os protocolos de digestão, ligação, transformação em *E. coli* quimicamente competente e *B. subtilis* foram realizados da mesma forma que os descritos no item 3.2. A construção está representada na Figura 3:

Figura 3: Sistema de expressão da L-Asparaginase II intracelular de *A. fischeri* por *B. subtilis*. Na figura, estão representados o promotor P_{veg} , o Sítio de Ligação do Ribossomo (RBS), o gene que codifica a enzima (*ansB Af*) e o terminador da transcrição.



Fonte: Autora (2020).

Considerando que a integração do gene ao cromossomo da bactéria acarreta em níveis de produção menores quando comparados à produção utilizando plasmídeos replicativos, foi testada a integração de mais de uma cópia da unidade de transcrição do gene *ansB* ao cromossomo da *B. subtilis*. Com isso, foram desenvolvidas linhagens de *B. subtilis* contendo uma, duas e quatro cópias deste gene em seu cromossomo.

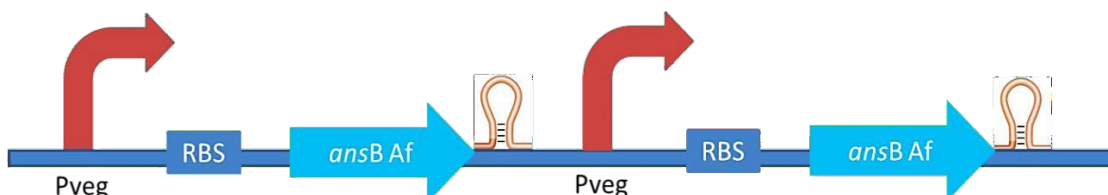
Primeiramente, a unidade de transcrição contendo o promotor constitutivo P_{veg} , Sítio de Ligação do Ribossomo, gene *ansB* e terminador da transcrição foi amplificada por PCR, utilizando como molde o plasmídeo pBS1C(A4481T)-*ansB*. O protocolo da reação foi o mesmo que o descrito no item 3.2, sendo a temperatura de anelamento 60°C e o tempo de extensão 1min.

Com isso, a unidade de transcrição e o pBS1K foram digeridos pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*. O plasmídeo foi desfosforilado pela enzima *FastAP* e o molde

utilizado na PCR para amplificação do inserto foi degradado pela *DpnI*. As digestões foram purificadas e os DNAs quantificados em leitor de placas. A proporção de plasmídeo e inserto utilizada na reação de ligação foi de 1:5 respectivamente, e o produto da ligação foi inserido *E.coli* JM109 quimicamente competente.

Além disso, a fim de adicionar duas cópias do gene da L-Asparaginase II ao plasmídeo pBS1K (cada cópia carregando as sequências do promotor, RBS e terminador de transcrição – Figura 4) uma das cópias do gene *ansB* foi digerida pelas enzimas *EcoRI* e *SpeI* (*BcuI*) e a outra foi digerida pela *XbaI* e *PstI*. Nas duas reações, houve degradação do molde da PCR pela *DpnI*. As extremidades resultantes da digestão pela *XbaI* e *SpeI* (*BcuI*) são complementares, o que possibilita que as sequências codificadoras liguem-se uma à outra. A *EcoRI* e a *PstI* fornecem as extremidades necessárias para que as duas sequências sejam ligadas ao plasmídeo. A proporção de plasmídeo e inserto aplicada na reação de ligação foi 1:5 respectivamente, e a ligação foi transformada em *E.coli* JM109 quimicamente competente.

Figura 4: Duas cópias do gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri* ligadas uma à outra. Cada cópia carrega as sequências do promotor Pveg, RBS e terminador da transcrição.



Fonte: Autora (2020).

Os plasmídeos extraídos das colônias resultantes dos processos de clonagem (cultivadas em LB líquido suplementado com ampicilina 100µg/mL durante 12 horas) foram digeridos pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* com o objetivo de verificar se a clonagem do gene que codifica a L-Asparaginase II de *Aliivibrio fischeri* foi bem-sucedida. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), 110 volts durante 40min, sendo esperado o tamanho 1.335bp para uma cópia da unidade de transcrição e 2.670bp para as duas cópias ligadas. Apenas o plasmídeo contendo uma cópia do gene *ansB* foi sequenciado, como descrito no item 3.2, no qual a temperatura de anelamento utilizada foi 55°C. O plasmídeo contendo as duas cópias não foi sequenciado, uma vez

que a sequência resultante apresenta um tamanho superior ao que o equipamento é capaz de sequenciar.

Com isso, as colônias positivas foram estocadas em glicerol 20% (v/v) em ultra freezer a -80°C e os plasmídeos positivos (pBS1K-*ansB* e pBS1K-2x(*ansB*)) foram integrados aos cromossomos das *B. subtilis* Δ6 e *B. subtilis* KO7 seguindo o protocolo da transformação descrito no item 3.2. As colônias resultantes das transformações foram cultivadas em meio LB líquido suplementado com canamicina 5,0μg/mL (antibiótico ao qual o pBS1K torna a *B. subtilis* resistente).

A confirmação das transformações foi realizada por PCR de colônia, para amplificação de uma e duas cópias do gene *ansB*, seguida pela corrida do produto desta reação em gel de agarose 1% (m/v), 110 volts durante 40min. Antes da PCR, foi necessário o rompimento das células de *B. subtilis* por tratar-se de uma bactéria gram-positiva. Para isto, 20,0μL das colônias cultivadas em meio líquido foram adicionados a 10,0μL de tampão TE. Esta mistura foi incubada em gelo durante 5 minutos e então foi submetida a 6 ciclos de choque térmico (1 minuto em forno micro-ondas e 30 segundos no gelo), seguidos por mais 5 minutos em gelo.

As condições da PCR de colônia foram: 2,0μL do tampão DreamTaq Green Buffer 10x, 1,0μL do primer *foward* 10,0μM, 1,0μL do primer *reverse* 10,0μM, 0,4μL de dNTPs 10,0mM, 0,1μL da Taq DNA Polimerase, 1,0μL das células rompidas e água ultrapura para completar o volume total de 20,0μL. O programa do termociclador consistiu em: desnaturação inicial – 95°C durante 5 minutos, desnaturação – 95°C por 30s, anelamento – 60°C por 30s, extensão – 1min30s (30s por kb), extensão final – 10min. Após a eletroforese em gel de agarose do produto da PCR, as colônias positivas foram estocadas em glicerol 20% (v/v) em ultra freezer a -80°C.

Para a integração de quatro cópias do gene *ansB* (cada uma contendo as sequências do promotor P_{veg}, RBS e terminador de transcrição) no genoma da *B. subtilis*, as duas cópias do gene, que foram previamente ligadas uma à outra e então ligadas ao plasmídeo pBS1K, foram amplificadas por PCR. A temperatura de anelamento foi 60°C e o tempo de extensão foi de 1 min 30s. A confirmação da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito anteriormente.

A eletroforese demonstrou que esta PCR amplificou outros fragmentos de DNA, além das duas cópias do gene *ansB*. Dessa forma, o fragmento correspondente às duas cópias da unidade de transcrição do gene que codifica a L-Asparaginase II unidas foi purificado diretamente do gel de agarose, utilizando o GeneClean® turbo kit (MR

Biomedicals™) e quantificado em leitor de placas. O DNA foi digerido pelas enzimas *Xba*I, *Pst*I (o molde da PCR foi degradado pela *Dpn*I) e ligado ao plasmídeo pBS1K-2x(*ansB*) (que apresenta 2 cópias do gene *ansB*) previamente digerido pelas enzimas *Spe*I (*Bcu*I), *Pst*I e desfosforilado pela *FastAP*. A ligação foi realizada como descrito no item 3.2, na qual a proporção plasmídeo e inserto foi 1:5 respectivamente. A transformação em *E.coli* JM109 quimicamente competente também ocorreu como descrita anteriormente.

A confirmação da clonagem foi feita através da digestão dos plasmídeos extraídos das colônias resultantes do processo pelas enzimas *Eco*RI e *Pst*I seguida pela eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), a 110 volts durante 40 minutos. O tamanho referente às quatro cópias do gene *ansB* ligadas uma a outra é de 5.340bp. Considerando que tamanho do plasmídeo digerido (6.068bp) e do fragmento correspondente a 4 cópias do gene da L-Asparaginase II são muito próximos, foram desenhados primers *foward* e *reverse* específicos para o plasmídeo pBS1K para possibilitar que uma segunda confirmação desta última clonagem fosse realizada através da PCR do plasmídeo resultante da mesma. O molde para a PCR foi selecionado de acordo com o resultado da eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) da digestão pelas enzimas *Eco*RI e *Pst*I dos plasmídeos obtidos na clonagem.

Com o objetivo de confirmar a integração do *ansB* no *locus amyE* do genoma das bactérias, as colônias de *B. subtilis* Δ6 e *B. subtilis* KO7 resultantes da transformação dos plasmídeos contendo uma, duas e quatro cópias das unidades de transcrição deste gene foram cultivadas em meio Luria-Bertani sólido suplementado com amido 1% (m/v) e canamicina 5,0μg/mL (os controles negativos, *B. subtilis* Δ6 e *B. subtilis* KO7 produtoras de amilase, foram cultivados em placas com os mesmos componentes exceto pelo antibiótico). Após 12 horas de incubação, foi adicionado iodo ao cultivo, com o objetivo de verificar se a bactéria havia deixado de degradar amido, uma vez que o iodo reage com o mesmo formando um complexo de cor azulada indicando que o gene foi integrado ao genoma. (LOUREIRO *et al.*, 2019).

3.4. Construção do sistema de exportação de proteínas por *B. subtilis*.

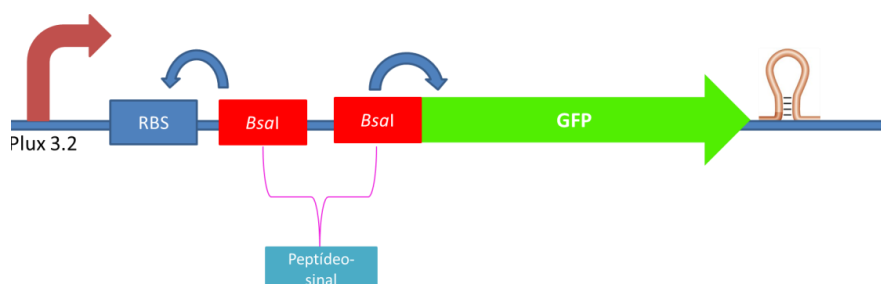
Em paralelo à integração do gene *ansB* ao genoma da bactéria *B. subtilis*, foi realizada a construção de um sistema de exportação de proteínas pela mesma bactéria. Para isto, utilizou-se a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês, *Green Fluorescent Protein*, BBa_E0040) como gene repórter para o teste de diferentes sequências de

peptídeo-sinal, possibilitando a escolha do peptídeo que resultasse na melhor exportação proteica.

O plasmídeo utilizado na construção do sistema de exportação foi o pBS1C. Este plasmídeo é integrativo em *B. subtilis*, ou seja, é capaz de se integrar no cromossomo da bactéria no *locus amyE*, substituindo o gene da amilase. Para não haver sítios de restrição entre a sequência do peptídeo-sinal e do gene repórter, foram adicionados à sequência do RBS R0 e da GFP, através dos *primers* utilizados na reação de PCR, o sítio de reconhecimento da enzima *BsaI*. A *BsaI* é uma enzima de restrição do tipo II, a qual cliva o DNA fora do seu sítio de reconhecimento, removendo o mesmo e deixando uma extremidade coesiva (WEBER *et al.*, 2011).

Nesta construção, foi aplicado um promotor forte sintético P_{lux}3.2 desenvolvido por CORRÊA, *et al.*, 2020. A Figura 5 representa a construção contendo os sítios de reconhecimento da *BsaI*, as sequências promotoras, a sequência codificadora da GFP (sem o ATG) e a região onde o peptídeo-sinal foi inserido.

Figura 5: Sistema de exportação para teste dos peptídeos-sinal utilizando a GFP como proteína repórter. Na figura está representada a região promotora P_{lux}3.2, o RBS R0, os sítios de reconhecimento da *BsaI*, o gene que codifica a GFP (-ATG) e o terminador da transcrição. As flechas em azul indicam onde a *BsaI* realiza a clivagem removendo seus sítios de reconhecimento os quais serão substituídos pela sequência do peptídeo-sinal.



Fonte: Aluna (2020).

Com o objetivo de remover o sítio da *BsaI* presente no pBS1C, para que a clonagem não fosse prejudicada pelo mesmo, realizou-se uma mutação sítio- dirigida, na qual uma adenina foi trocada por uma timina, na posição 4481 do plasmídeo, resultando assim na remoção do sítio de reconhecimento da enzima e garantindo que o peptídeo-sinal fosse inserido na posição correta (*upstream* o gene repórter). A mutação sítio-

dirigida ocorreu através de uma reação de PCR com a enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific™) com os seguintes componentes: 4,0μL do tampão 5X Phusion™ HF Buffer, 0,4μL de dNTPs 10,0mM, 0,15μL do primer *forward* 10,0μM, 0,15μL do primer *reverse* 10,0μM, DNA molde (10,0ng do DNA plasmidial), 0,4μL da Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (0,04 U/μL) e água ultrapura para completar os 20,0μL totais de reação. As sequências dos primers para a reação foram criadas com o *software* PrimerX (*Automated design of mutagenic primers for site-directed mutagenesis* - https://www.bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/DNA_1.cgi).

As condições no termociclador foram: desnaturação inicial - 95°C por 1 min, desnaturação - 95°C por 50s, anelamento - 55°C por 50s, extensão - 72°C por 4 min (1 min por kb), extensão final - 72°C por 7min e *Hold* - 4°C por tempo indeterminado, sendo 18 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Após o término da reação, foi adicionado 1,0μL da enzima *DpnI* a fim de degradar o molde utilizado na PCR e então a reação foi incubada a 37°C durante 1 hora. Em seguida, foi realizada a transformação de 2,0μL do produto desta reação em *E. coli* TOP quimicamente competente, como descrita no item 3.2.

A confirmação da mutação sítio-dirigida foi realizada pela comparação entre bandas resultantes da corrida em gel de agarose 1% das digestões pelas enzimas *EcoRI* e *BsaI*, do plasmídeo molde (controle) e do plasmídeo extraído das colônias resultantes da transformação do produto da mutação (pBS1C(A4481T)).

Após a mutação, as sequências da região promotora e do gene repórter foram inseridas no plasmídeo utilizando as enzimas de restrição do *Biobrick* prefixo e sufixo. Primeiramente, estas sequências foram amplificadas por PCR, com a TIME ECRA HIFI DNA Polimerase, como descrito no item 3.2, sendo a temperatura de anelamento igual a 55°C e tempo de extensão 40s. O RBS foi adicionado a região promotora pelo *primer reverse* utilizado na PCR e os sítios de reconhecimento da *BsaI*, assim como o *Biobrick* prefixo e sufixo também foram adicionados a região promotora e ao gene que codifica a GFP (-ATG) através da PCR.

Após confirmação das reações em gel de agarose 1% (m/v), a 110 volts durante 40 minutos, e a purificação e quantificação em leitor de placas, a sequência da região promotora foi digerida pelas enzimas *EcoRI* e *SpeI* (*BcuI*) e da GFP (-ATG) pelas enzimas *XbaI* e *PstI*. A *DpnI* foi aplicada nas duas reações para degradação do molde da PCR. O plasmídeo foi digerido pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* e desfosforilado pela *FastAP*. O protocolo das reações foi o mesmo que o descrito no item 3.2.

Dessa forma, a região promotora se liga ao gene repórter, uma vez que as enzimas *XbaI* e *SpeI* (*BcuI*) possuem extremidades complementares (sendo seus sítios de reconhecimento desfeitos após a ligação) e então os dois insertos se ligam ao plasmídeo formando a unidade de transcrição representada pela Figura 5. A reação de ligação foi realizada como descrito no item 3.2 e a proporção entre plasmídeo e inserto foi 1:5 respectivamente. A construção foi transformada em *E. coli* TOP10 quimicamente competente, como descrito anteriormente, e a clonagem foi confirmada por sequenciamento, como descrito no item 3.2, utilizando 55°C como temperatura de anelamento.

Paralelamente, foram escolhidas oito sequências de peptídeos-sinal pertencentes ao sistema Sec e Tat de exportação. Estas sequências foram sintetizadas como oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, sendo necessário o seu anelamento. Para isto, 20,0µL de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*) foram adicionados a 80,0µL de tampão TE (Tris-HCL 10,0mM, EDTA 0,1mM, pH 8,0), sendo a concentração final da mistura igual a 10,0µM. Além disso, as sequências foram sintetizadas com as extremidades coesivas complementares as extremidades resultantes da digestão do plasmídeo pBS1C(A4481T) pela enzima *BsaI*. Dentre os peptídeos escolhidos, os que sinalizam para a exportação através do sistema Sec são: AmyE, CotC, NucB, PhoB e YncM. Enquanto os pertencentes ao sistema Tat são: LipA, WapA^W, YwbN. (TJALSMA *et al.*, 2000). A Figura 6 representa a construção final, após a digestão do plasmídeo pela enzima *BsaI* e a substituição dos seus sítios de reconhecimento pela sequência do peptídeo-sinal.

Figura 6: Sistema de exportação construído para testar diferentes sequências de peptídeo-sinal, utilizando o gene da GFP como repórter. A figura representa a sequência promotora Plux3.2, o RBS, o peptídeo-sinal que substituiu os sítios de reconhecimento da *BsaI*, o gene que codifica a GFP e o terminador da transcrição.



Fonte: Autora (2019).

O processo de clonagem das sequências codificadoras dos peptídeos-sinal foi otimizado através da construção de uma biblioteca de peptídeos-sinal. Para isto, foi elaborada uma mistura das sequências destes oito peptídeos (na proporção 1:1 para uma concentração final de 100,0ng/μL). Esta mistura foi utilizada como inserto de forma que a transformação em *E. coli* TOP10 quimicamente competente resultou em diferentes colônias contendo diferentes peptídeos-sinal. Após diversas tentativas, variando as condições da clonagem, a proporção 1:50 usada na ligação entre o plasmídeo e o mix de peptídeos-sinal, respectivamente, foi a condição que fez a clonagem ser bem sucedida. Com isso, foram coletadas as colônias que ficaram fluorescentes nas placas resultantes da transformação, quando visualizadas sob a luz azul, além de colônias que não apresentaram fluorescência visual. Realizou-se a extração dos plasmídeos destas colônias e quantificação em leitor de placas, seguida pelo seu sequenciamento (item 3.2) no qual a temperatura de anelamento foi 60°C.

Com isso, os plasmídeos que continham a sequência codificadora de peptídeo-sinal foram inseridos em *B. subtilis* KO7, como descrito no item 3.2. Esta cepa foi escolhida uma vez que a *B. subtilis* Δ6 apresenta, na ausência de plasmídeo, a mesma resistência a antibiótico fornecida pelo pBS1C(A4481T), o que inviabiliza a seleção das colônias positivas. Além disso, a *B. subtilis* KO7 não produz proteases extracelulares (BGSCID 1A1133).

O teste de exportação foi realizado pela análise da fluorescência (nos comprimentos de onda de excitação e emissão característicos da GFP, 485nm e 535nm, respectivamente, de acordo com OVERKAMP *et al.*, 2013) do sobrenadante resultante do cultivo de 24 horas em meio Power (extrato de levedura 1,0g/L, NaNO₃ 25,0 g/L, KH₂PO₄ 0,333 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,15 g/L, CaCl₂ (dihidratado) 0,0099 g/L, MnSO₄.H₂O 0,006 g/L, FeSO₄.7H₂O 0,006 g/L, Na₂HPO₄.12H₂O 0,1% (v/v) e sacarose 7% (v/v), pH 7,0) líquido suplementado com o antibiótico ao qual o plasmídeo fornece resistência (cloranfenicol 5,0 μg/mL). O meio Power foi escolhido por ser transparente, o que diminui a interferência do meio de cultivo na leitura da fluorescência nos comprimentos de onda utilizados. Os valores obtidos foram comparados com a fluorescência do controle negativo (*B. subtilis* KO7 não produtora de GFP).

Além disso, as células resultantes dos cultivos, após terem sido centrifugadas (10min a 17.000xg) e ressuspensas em salina 1% (m/v), também tiveram sua fluorescência medida nos comprimentos de onda respectivos da GFP. Os valores de

fluorescência do sobrenadante foram normalizados pelo volume utilizado na leitura e os das células foram normalizados pela densidade óptica a 600nm.

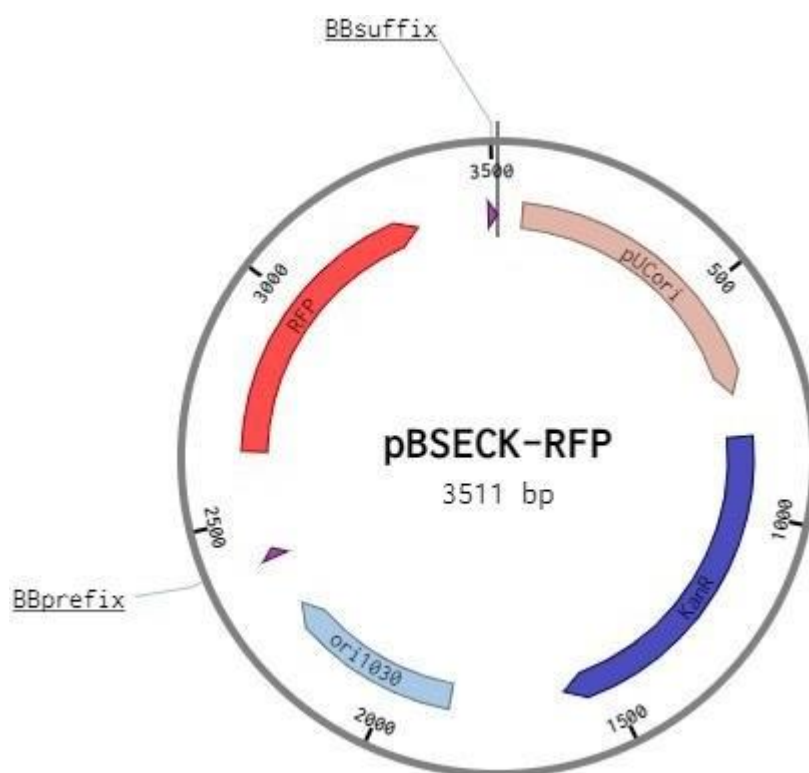
Foram realizadas duas rodadas de clonagem do mix de peptídeos-sinal. O teste de exportação das bactérias que apresentaram fluorescência resultantes da primeira rodada foi realizado em 5,0 mL de meio Power. Já o teste de exportação da GFP pelas linhagens resultantes da segunda rodada foi realizado em microescala (400,0 µL de meio Power) a fim de facilitar o processo de cultivo e análise dos resultados, uma vez que esta etapa gerou um número elevado de colônias fluorescentes. Com isso, as linhagens de *B. subtilis* resultantes desta última rodada que foram capazes de gerar maior exportação da GFP e as linhagens obtidas na primeira clonagem foram novamente cultivadas em 5,0 mL de meio Power, sendo tiradas amostras após 12 e 24 horas de cultivo para a análise de exportação.

3.5. Construção do sistema de exportação da L-Asparaginase II

De acordo com os resultados obtidos a partir da integração do gene *ansB* ao genoma do *B. subtilis* e a partir do teste de exportação, optou-se por construir o sistema de exportação da L-Asparaginase II utilizando um plasmídeo replicativo e o peptídeo-sinal NucB. A coleção de plasmídeos do laboratório não continha um plasmídeo replicativo em *B. subtilis* que não apresentasse o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *BsaI* (utilizada na clonagem do peptídeo-sinal). Dessa forma, foi construído um novo plasmídeo utilizando a técnica Golden Gate o qual levou a denominação pBSECK-RFP. (MARILLONNET, *et al.*, 2020).

Para isto, as partes que foram ligadas para formar o vetor foram isoladas e amplificadas por PCR, TIME ECRA HIFI DNA Polimerase, como descrito no item 3.2, na qual a temperatura de anelamento foi 60°C e tempo de extensão 1min. A parte que levou a denominação de Parte A consistia na origem de replicação em *E. coli* pUCori e no gene de resistência a canamicina com seu respectivo promotor e RBS, a Parte B continha a origem de replicação em *B. subtilis* ori1030 e a Parte C consistiu na unidade de transcrição do gene da Proteína Vermelha Fluorescente (RFP, do inglês *Red Fluorescent Protein*, BBa_E1010). Os primers utilizados na PCR para amplificação de cada parte adicionaram os sítios de reconhecimento da enzima *BsaI* e as sequências necessárias para que as extremidades resultantes da digestão das três partes pela enzima fossem complementares permitindo a ligação entre elas. O plasmídeo resultante está na Figura 7.

Figura 7: Plasmídeo pBSECK-RFP replicativo em *E. coli* e *B. subtilis* construído pelo método Golden Gate. O plasmídeo contém o gene de resistência a canamicina (KanR), o gene que codifica a RFP e as origens de replicação pUCori e ori1030.



Fonte: Autora (2021).

Após a confirmação das reações de PCR em gel de agarose 1% (m/v), 40 minutos a 110v, foram adicionados 2,5 µL da enzima *DpnI* aos tubos contendo as reações, com o objetivo de degradar os moldes utilizados no processo. As amostras foram incubadas a 37°C durante 16 horas, e então purificadas e quantificadas em leitor de placa. Com isso, foi possível realizar o Golden Gate.

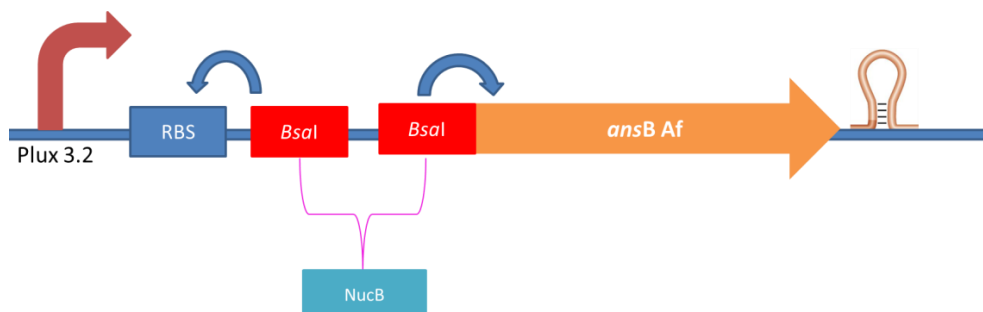
Para isto foram misturados 20 ng da Parte A, 100 ng das partes B e C, 0,5 µL de *BsaI*, 0,5 µL de T4 DNA Ligase, 2 µL de tampão 10x T4 Buffer e água ultrapura até completar 20 µL. A reação foi incubada em termociclador o qual foi programado para fazer 100 ciclos de 37°C por 5 min e 16°C por 5 min seguidos pela inativação das enzimas a 80°C durante 20 min. (<http://2017.igem.org/Team:Hamburg/GGProtocoll>). Com isso, 2 µL resultantes do Golden Gate foram inseridos em *E.coli* JM109 quimicamente competente, como descrito no item 3.2, e as colônias que tiveram coloração vermelha foram coletadas das placas resultantes da transformação (LB suplementado com canamicina 50 µg/mL) e cultivadas em meio líquido. Os plasmídeos extraídos destas

bactérias, assim como o molde usado na PCR da Parte A (controle negativo) e o molde da PCR da Parte C (controle positivo), foram digeridos pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* com o objetivo de confirmar a presença da RFP. Após a confirmação, a colônia contendo o pBSECK-RFP foi estocada a -80°C em glicerol a 20%.

A etapa seguinte foi a adição da sequência promotora $P_{lux3.2}$, do RBS R0 e do gene *ansB* sem o ATG ao plasmídeo pBSECK. Para isto, a região promotora e o gene da *ansB* (-ATG) foram amplificados por PCR (como descrito no item 3.2), sendo a temperatura de anelamento igual a 55°C e tempo de extensão 1min e os primers aplicados na reação adicionaram os sítios de reconhecimento da *BsaI* e as sequências do *Biobrick* prefixo e sufixo. As PCRs foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) (110v por 40 min), purificadas e quantificadas em leitor de placas.

Em seguida, a sequência promotora foi digerida pelas enzimas *EcoRI* e *SpeI* (*BcuI*) e o gene *ansB* (-ATG) pela *XbaI* e *PstI* (nas duas reações foi adicionada a *DpnI* para degradar os moldes das PCRs) e o plasmídeo foi digerido pela *EcoRI* e *PstI* e desfosforilado pela *FastAP*. Dessa forma, a sequência promotora e o gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri* ligaram-se entre si e ao plasmídeo na reação catalisada pela T4 DNA Ligase, como foi descrita no item 3.2, na qual foi utilizada a proporção 1:5 entre o plasmídeo e os insertos respectivamente. A construção foi similar à utilizada no teste de exportação para a escolha do peptídeo-sinal e está representada na Figura 8:

Figura 8: Sistema de exportação da L-Asparaginase II, a região promotora é composta pelo promotor sintético $P_{lux 3.2}$. Além disso, a figura representa o RBS, os sítios de reconhecimento da *BsaI*, o gene que codifica a L-Asparaginase II e o terminador da transcrição. As flechas em azul indicam onde a *BsaI* irá clivar e o local onde o NucB será ligado (*upstream* o gene *ansB*).



Fonte: Autora (2021).

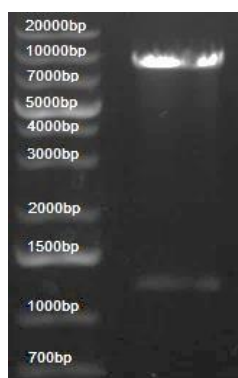
O plasmídeo resultante da ligação foi inserido em *E. coli* TOP 10 quimicamente competente, como descrito anteriormente, a qual foi cultivada em LB sólido suplementado com canamicina 50 µg/mL. Com isso, 4 colônias resultantes da transformação foram inoculadas em LB líquido com canamicina 50 µg/mL e os plasmídeos extraídos delas foram digeridos pela *BsaI* com o objetivo de conferir se o sítio de reconhecimento da enzima foi inserido com sucesso. Em seguida, os plasmídeos que apresentaram o tamanho esperado após a digestão (resultado observado em gel de agarose 1%, 110v por 40 minutos) foram sequenciados, como descrito no item 3.2, utilizando 60°C como temperatura de anelamento. A colônia positiva foi estocada em glicerol 20% a -80°C.

4. Resultados e Discussão

4.1. Confirmação da clonagem e expressão do gene da L-Asparaginase II de *Aliivibrio fischeri* em *Bacillus subtilis*.

Após a confirmação da PCR da sequência codificadora da L-Asparaginase II de *A. fischeri*, esta foi purificada e digerida pelas enzimas *EcoRI* e *PstI*, assim como o plasmídeo pBS0EXylR-PxylA. Ambos foram ligados e o plasmídeo resultante foi inserido em *E. coli* TOP10 quimicamente competente. O plasmídeo extraídos da colônia obtidas da transformação foi digerido pelas mesmas enzimas com o objetivo de confirmar a inserção do pBS0EXylR-PxylA-*ansB* na bactéria. Em gel de agarose, foi possível observar os fragmentos gerados pela digestão, e, com isso, confirmar a clonagem.

Figura 9: Fragmentos resultantes da digestão pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* do plasmídeo gerado na clonagem do gene *ansB* no plasmídeo pBS0EXylR-PxylA. Os fragmentos apresentam os tamanhos 8.035bp e 1221bp, o primeiro referente ao plasmídeo digerido e o segundo ao gene que codifica a L-Asparaginase II após a digestão.



Fonte: Autora (2019).

Como é possível observar na figura, os fragmentos apresentavam 8.035 bp (pBS0EXylR-PxylA digerido) e 1.221 bp (*ansB* digerido) confirmando o sucesso da clonagem. Dessa forma o plasmídeo foi sequenciado. O alinhamento entre a sequência esperada e a fornecida pelo sequenciador está na Figura 10.

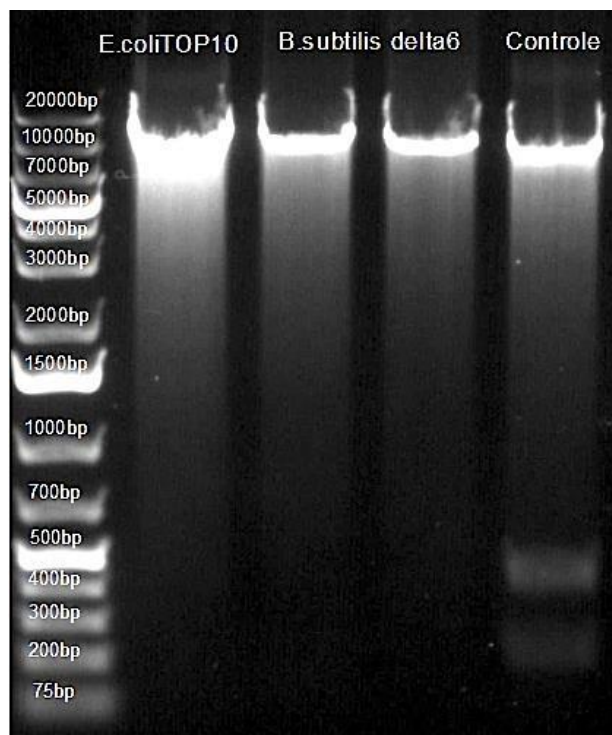
Figura 10: Sequenciamento do pBS0EXylR-PxylA-*ansB*. Seq 1 é a sequência esperada e Seq 2 é a sequência fornecida pelo sequenciador. Em rosa está representado o promotor PxylA, em roxo o operador, em azul está o Sítio de Ligação do Ribossomo e em vermelho o gene *ansB*. Como demonstrado pela figura, o alinhamento entre as sequências permite concluir que a clonagem funcionou.

Seq_1	2038	TATAAGATGAAAAATAAGTTAGTTTGTITAAACAACAACTAATAGGTGATGTACTTACTA	2097
Seq_2	105	TATAAGATGAAAAAAGTTAGTTTGTITAAACAACAACTAATAGGTGATGTACTTACTA	164
Seq_1	2098	TATGAAATAAAATGCATCTGTAGAATTCAAAAAAAATTCTAGAGAGCTGATTAACTAAT	2157
Seq_2	165	TATGAAATAAAATGCATCTGTAGAATTCAAAAAAAATTCTAGAGAGCTGATTAACTAAT	224
Seq_1	2158	AAGGAGGACAAACATGAAAAAGAATGCCATTGCAGTAGGTATGTTGCTTTCTGGTCTTTG	2217
Seq_2	225	AAGGAGGACAAACATGAAAAAGAATGCCATTGCAGTAGGTATGTTGCTTTCTGGTCTTTG	284
Seq_1	2218	CTTTAGCTCAATCAGTCTTGCTGATGATTTACCAAATATTAAAATCTTAGCGACTGGCGG	2277
Seq_2	285	CTTTAGCTCAATCAGTCTTGCTGATGATTTACCAAATATTAAAATCTTAGCGACTGGCGG	344

Fonte: Alinhamento realizado no *software* SerialCloner 2.6.1.

O alinhamento representado na Figura 10 demonstra que a clonagem do gene *ansB* de *A. fischeri* foi bem sucedida. Dessa forma, o pBS0EXylR-PxylA-*ansB* foi inserido em *B. subtilis* Δ6. Com o objetivo de confirmar a transformação, os plasmídeos foram extraídos das colônias resultantes do processo e então digeridos pela enzima de restrição *HindIII*. O controle negativo foi o pBS0EXylR-PxylA, o qual não apresenta o gene *ansB*, e sim o gene da proteína vermelha fluorescente (RFP, do inglês *Red Fluorescent Protein*) (POPP *et al.*, 2017). Os fragmentos esperados para controle negativo eram os de tamanho 8.479bp, 440bp e 222bp, enquanto esperava-se apenas o fragmento de 9.256bp para a clonagem positiva, referente ao plasmídeo linear, o que pode ser observado na Figura 11.

Figura 11: Fragmentos gerados na digestão pela enzima *Hind*III do plasmídeo resultante da clonagem do gene *ansB*, propagado em *E. coli* TOP10, sequenciado e então inserido em *B. subtilis* $\Delta 6$ e do controle negativo das clonagens. A presença de um fragmento de 9.256bp após a digestão dos plasmídeos extraídos de *E. coli* TOP10 e *B. subtilis* $\Delta 6$ e de três fragmentos de 8.479bp, 440bp e 222bp resultantes da digestão do controle negativo indicam que a bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ foi transformada com o pBS0EXylR-PxylA-*ansB*



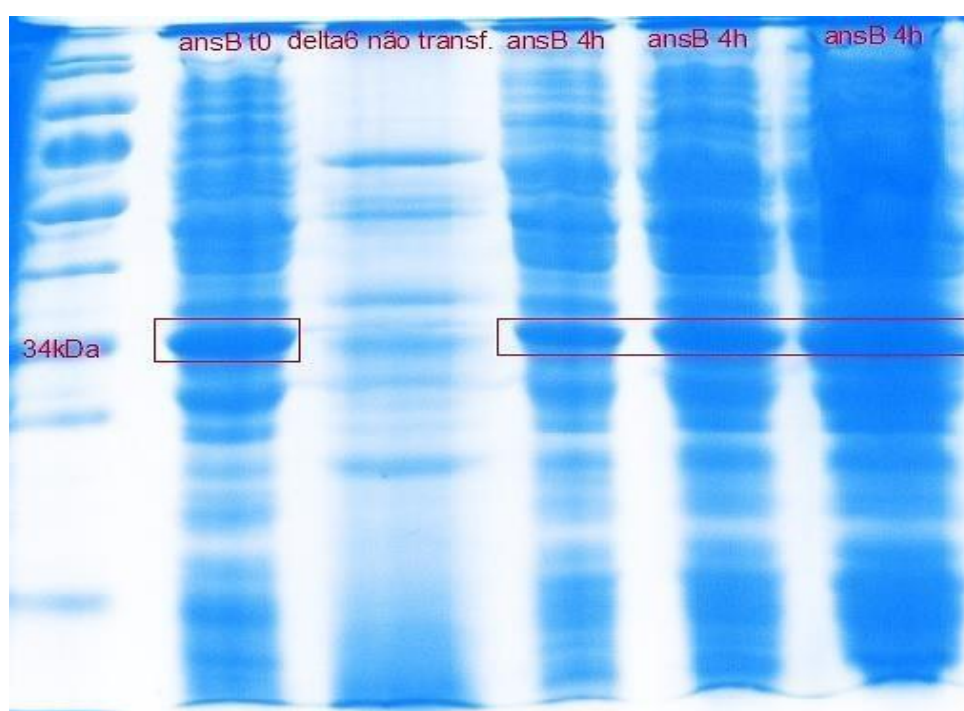
Fonte: Autora (2019).

De acordo com a Figura 11, foi confirmada a transformação do plasmídeo pBS0EXylR-PxylA-*ansB* em *B. subtilis* $\Delta 6$, uma vez que a sua digestão pela *Hind*III resultou no fragmento esperado (9.256bp) e do mesmo tamanho do fragmento gerado pela digestão do mesmo plasmídeo extraído de *E. coli* TOP10 o qual foi sequenciado. Além disso, os fragmentos tinham tamanhos diferentes do controle negativo (8.479bp, 440bp e 222bp).

A confirmação da expressão do gene da L-Asparaginase II em *B. subtilis* $\Delta 6$ foi realizada através do cultivo da bactéria e indução da expressão por xilose. Foram retiradas amostras no momento da indução e 4 horas após a adição de xilose. As células foram rompidas e então realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do produto do rompimento celular (marcador: PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo

Fisher Scientific™). A massa molecular esperada era de 37,5 kDa, como é possível observar na Figura 12. O controle negativo da expressão consistiu na bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ não produtora de L-Asparaginase II.

Figura 12: Resultado obtido da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do conteúdo celular após rompimento das células de *B. subtilis* $\Delta 6$ contendo o plasmídeo com o gene *ansB* e do controle negativo (não transformado). O tempo t0 refere-se ao cultivo no momento da indução ($OD_{600} = 0,7$) e *ansB* 4h corresponde às células rompidas 4 horas após a indução. Foram aplicados ao gel volumes de extrato celular iguais a 5,0 (colunas 2-4), 10,0 (coluna 5) e 15,0 μ L (coluna 6).



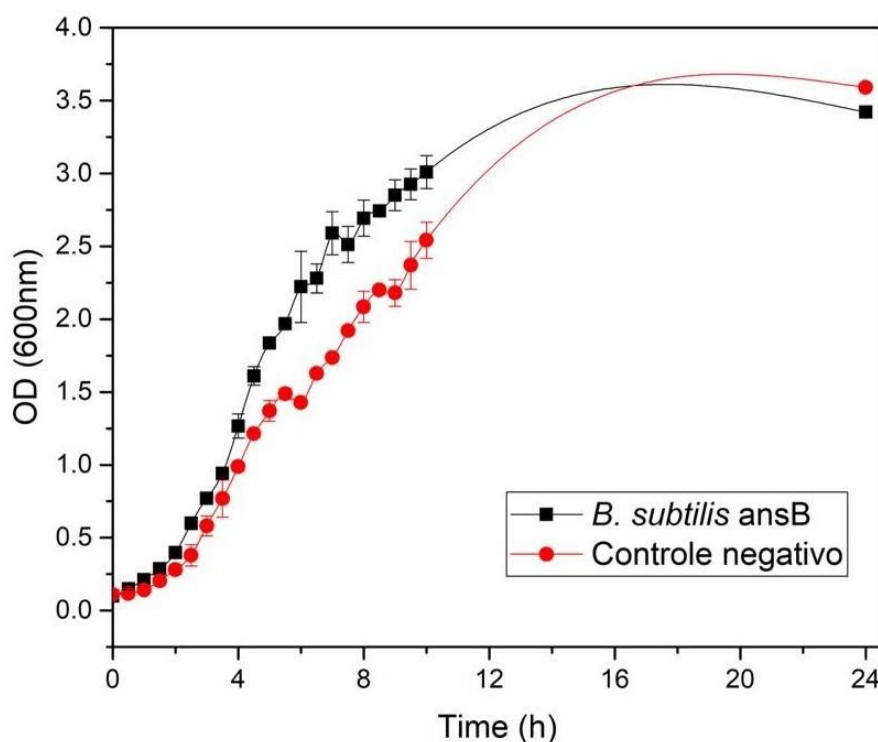
Fonte: Autora (2019).

Na figura, o tempo t0 refere-se ao cultivo no momento da indução ($OD_{600} = 0,7$) e *ansB* 4h consiste nas células rompidas após 4 h a partir da indução. Nas colunas 2 a 4 foram aplicados 5,0 μ L de extrato celular enquanto nas colunas 5 e 6 foram aplicados 10,0 e 15,0 μ L respectivamente. Dessa forma, é possível concluir que a L-Asparaginase II está sendo produzida pela bactéria, uma vez que os cultivos apresentaram bandas significativas na região esperada para uma subunidade da proteína (37,5 kDa), enquanto o controle negativo apresentou uma banda pequena nesta região a qual possivelmente corresponde à Asparaginase endógena. (FENG, *et al.*, 2017).

Além disso, observou-se que a enzima foi produzida antes da indução por xilose, o que significa que ocorreu o “vazamento” do promotor, ou seja, este não foi eficientemente reprimido na ausência do açúcar. Mesmo ocorrendo a produção da L-Asparaginase II antes da indução, o crescimento celular não foi prejudicado, significando que não é necessário o uso de um promotor induzível.

A Figura 13 representa a curva de crescimento da bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ transformada com o pBS0EXylR-PxylA-*ansB* (*B. subtilis ansB*) e da *B. subtilis* $\Delta 6$ não transformada.

Figura 13: Curva de crescimento da bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ transformada com o pBS0EXylR-PxylA-*ansB* (preto) e da bactéria *Bacillus subtilis* $\Delta 6$ não transformada (vermelho).



Fonte: Autora em conjunto com o profissional de Pós-doutorado Heitor Bento (2021).

As curvas de crescimento demonstram que a bactéria transformada com o pBS0EXylR-PxylA-*ansB* não teve seu crescimento prejudicado, uma vez que as fases de crescimento duraram aproximadamente o mesmo período de tempo que o controle negativo. Além disso, os valores de OD_{600nm} foram superiores aos do controle, indicando

que a bactéria transformada teve crescimento superior. De acordo com a curva, foi testado o tempo ideal para a indução. Para isto, foram determinados os valores de proteínas totais, atividade e atividade específica da enzima e OD_{600nm} na ausência da indução e após 24 h de indução realizada em diferentes valores de OD_{600nm}, sendo estes 0,7; 1,0 (ambos no início da fase exponencial) e 1,5 (meio da fase exponencial). Os resultados estão na Tabela 2.

Tabela 3: Teste do tempo ideal para a indução. A tabela apresenta os valores de proteínas totais, atividade e atividade específica da enzima sem a indução e 24 horas após diferentes tempos de indução (início e meio da fase exponencial).

Amostra	Proteínas totais (mg/L)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Controle Negativo	2863,69 ± 56,42	0,23 ± 0,004	0,0807
Sem indução	5116,36 ± 222,38	2,59 ± 0,12	0,506
Indução OD=0,7	4831,80 ± 343,62	3,23 ± 0,29	0,668
Indução OD = 1,0	5131,51 ± 185,86	3,29 ± 0,22	0,641
Indução OD = 1,5	4939,09 ± 136,40	2,81 ± 0,24	0,569

Fonte: Autora em conjunto com o profissional de Pós-doutorado Heitor Bento (2021).

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que os valores de atividade específica da L-Asparaginase II apresentaram pequena variação quando comparados entre os diferentes tempos de indução e com o valor obtido na ausência da indução (comprovando o vazamento do promotor), além de serem maiores que a atividade específica do controle negativo, indicando a produção da L-Asparaginase II de *A. fischeri* pela bactéria transformada com o pBS0EXylR-PxylA-ansB. Apesar da enzima estar ativa, observa-se a necessidade de otimizar as condições de produção da mesma, uma vez que NGUYEN, *et al.*, (2016) obteve uma atividade de 353,2 U/mg da L-Asparaginase II de *E. chrysanthemi*, o que é significativamente superior a obtida neste trabalho.

Além disso, apesar do vazamento do promotor, o maior valor de atividade específica foi obtido quando a indução foi realizada a OD_{600nm} de 0,7. Ademias, considerando a curva de crescimento da bactéria transformada e que a enzima está sendo

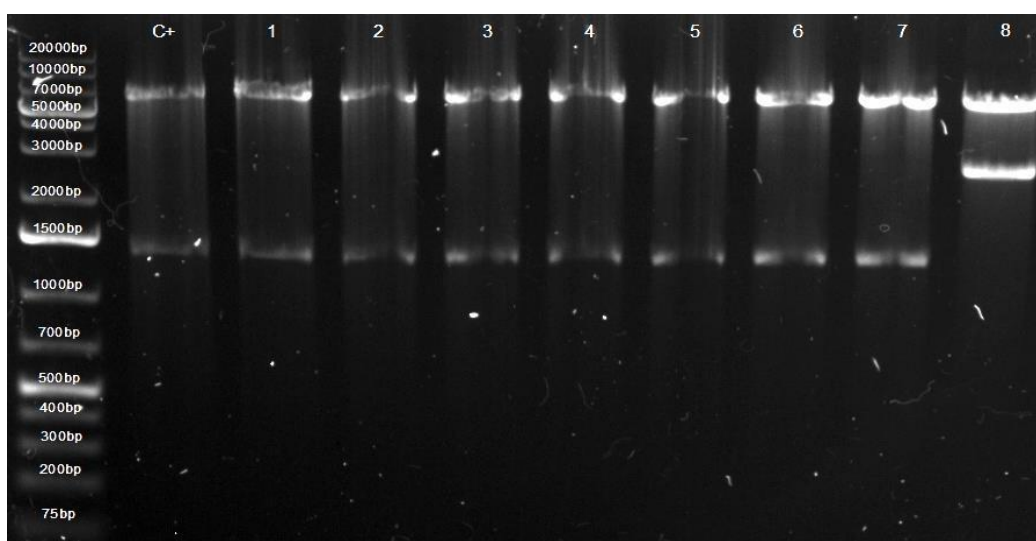
produzida na ausência de indução, concluiu-se que a sua produção não está prejudicando o crescimento da bactéria.

Dessa forma, iniciou-se a etapa de construção dos sistemas de integração do gene *ansB* ao genoma da *B. subtilis* e, em paralelo, do sistema de exportação de proteína pela bactéria, ambos utilizando promotores constitutivos.

4.2. Integração do gene da L-Asparaginase II no genoma da *B. subtilis*.

Em simultâneo à construção do sistema de exportação proteica pela bactéria *B. subtilis*, foi elaborada uma construção como alternativa à exportação, na qual o gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri*, sob controle do promotor constitutivo P_{veg} , é integrado ao genoma das bactérias *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7. A Figura 14 apresenta os fragmentos de DNA resultantes das digestões por *EcoRI* e *PstI* dos plasmídeos extraídos da *E. coli* com o intuito de confirmar a clonagem de uma e de duas cópias do gene *ansB* (cada cópia contendo o promotor, RBS e terminador da transcrição).

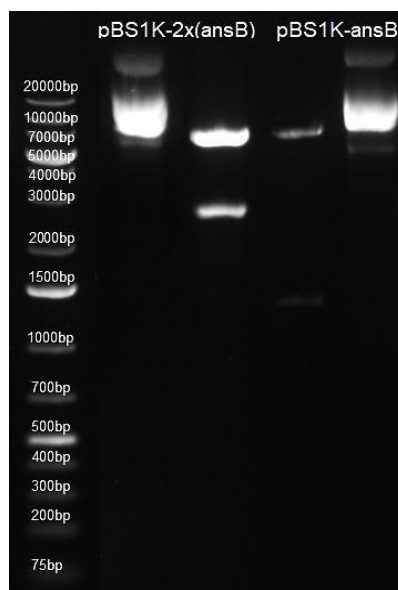
Figura 14: Confirmação da clonagem de uma e duas cópias do gene *ansB* sob controle do promotor constitutivo P_{veg} . O C+ é o controle positivo (pBS1C(A4481T)- *ansB*), as colunas 1 a 7 correspondem a clonagem de uma cópia do gene *ansB* e a coluna 8 à clonagem de duas cópias deste gene. Os fragmentos de 6.511bp (plasmídeo digerido) 1.335bp (uma cópia do gene *ansB*) nas colunas 1-7 indicam que a clonagem do pBS1K- *ansB* em *E. coli* funcionou. Na coluna 8, a presença das bandas de 6.511bp e 2.730bp (duas cópias de *ansB*) permite concluir que a clonagem de 2 cópias do *ansB* foi bem sucedida.



Fonte: Autora (2020).

Como demonstra a figura, o controle consistiu no plasmídeo pBS1C(A4481T)-*ansB*. Os números 1 ao 7 representam o teste da clonagem de uma cópia deste gene no plasmídeo pBS1K (mesma sequência que o pBS1C, difere apenas pelo gene de resistência à canamicina ao invés do gene de resistência a cloranfenicol), através da digestão pelas enzimas *EcoRI* e *PstI*. O número 8 é o resultado da digestão, pelas mesmas enzimas, do plasmídeo extraído da colônia obtida na clonagem de duas cópias do gene no pBS1K. Todos os fragmentos apresentaram os tamanhos esperados: 6.511bp (plasmídeo digerido), 1.335bp (uma cópia do gene *ansB*) e 2.730bp (duas cópias de *ansB*). A Figura 15 demonstra o resultado de uma nova eletroforese em gel de agarose do pBS1K-*ansB* (uma cópia) e pBS1K-2x(*ansB*) (duas cópias) digeridos e dos plasmídeos não digeridos (controle).

Figura 15: Plasmídeos pBS1K-*ansB* e pBS1K-2x(*ansB*) digeridos pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* e não digeridos. As duas primeiras colunas correspondem ao pBS1K- 2x(*ansB*) não digerido e digerido respectivamente. Os fragmentos de 6.511bp (plasmídeo digerido), 2.730bp na segunda coluna indicam a presença de duas cópias do gene *ansB* e o plasmídeo não digerido (primeira coluna) apresenta o tamanho esperado (9.241bp). Nas duas últimas colunas foram adicionados o pBS1K-*ansB* digerido e não digerido respectivamente. Os fragmentos de 6.511bp (plasmídeo digerido), 1.335bp na coluna do pBS1K-*ansB* digerido confirmam a presença de uma cópia do *ansB* e a última coluna demonstra que o plasmídeo possui o tamanho esperado (7.846bp).



Fonte: Autora (2020).

De acordo com a Figura 15, foi confirmado que o plasmídeo pBS1K-2x(*ansB*) possui as duas cópias do gene da L-Asparaginase II e o pBS1K-*ansB* apresenta uma única cópia do mesmo, uma vez que apresentaram os fragmentos esperados (2.730 bp e 1.335 bp respectivamente), diferente dos plasmídeos não digeridos pelas enzimas de restrição. O pBS1K-2x(*ansB*) não digerido resultou no fragmento de aproximadamente 9.241bp e o pBS1K-*ansB* no fragmento próximo de 7.846bp, como esperado. Dessa forma, foi realizado o sequenciamento do pBS1K-*ansB* para confirmação do resultado. Não foi possível sequenciar o pBS1K-2x(*ansB*), pois o sequenciador utilizado neste trabalho não seria capaz de fornecer a sequência das duas cópias do gene devido ao seu tamanho.

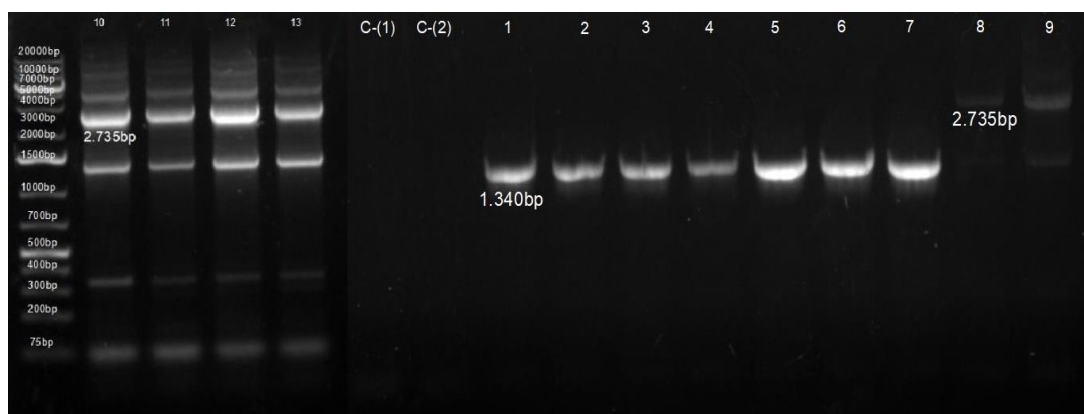
Figura 16: Sequenciamento do pBS1K-*ansB*. Seq 1 é a sequência esperada e Seq 2 corresponde à sequência fornecida pelo sequenciador. Em azul está representado o promotor Pveg, em roxo o Sítio de Ligação do Ribossomo (RBS) e em vermelho o gene *ansB*. O alinhamento entre as sequências demonstra que a clonagem de uma cópia do gene *ansB* foi bem sucedida.

Seq_1	6541	TAATTTTATTGACAACGCTTATTAACGTTGATACCGGTTAAATTTATTTGACAAAAAT	6600
Seq_2	66	TAATTTTATTGACAACGCTTATTAACGTTGATACCGGTTAAATTTATTTGACAAAAAT	125
Seq_1	6601	GGGCTCGTGTGTACAATAAATGTGCTAGCGATTAACTAATAAGGAGGACAACTActag	6660
Seq_2	126	GGGCTCGTGTGTACAATAAATGTGCTAGCGATTAACTAATAAGGAGGACAACTACTAG	185
Seq_1	6661	AGATGAAAAAGAATGCCATTGCAGTAGGTATGTTGCTTTCTGGTCTTTGCTTTAGCTCAA	6720
Seq_2	186	AGATGAAAAAGA-TGCCATTGCAGTAGGTATGTTGCTTTCTGGTCTTTGCTTTAGCTCAA	244
Seq_1	6721	TCAGTCTTGCTGATGATTTACCAAATATTAAAATCTTAGCGACTGGCGGTACTATTGCTG	6780
Seq_2	245	TCAGTCTTGCTGATGATTTACCAAATATTAAAATCTTAGCGACTGGCGGTACTATTGCTG	304

Fonte: Alinhamento realizado no *software* SerialCloner 2.6.1.

De acordo com a Figura 16, o alinhamento entre a sequência esperada e a fornecida pelo sequenciamento permitiu concluir que a clonagem de uma cópia do *ansB* funcionou. Dessa forma, o plasmídeo positivo de cada clonagem (pBS1K-*ansB* e pBS1K-2x(*ansB*)) foi inserido em *B. subtilis* Δ6 e *B. subtilis* KO7 para integração no seu genoma. A figura abaixo apresenta o resultado da PCR de colônia das bactérias obtidas após a transformação:

Figura 17: Fragmentos resultantes da PCR de colônia para testar a integração de uma e duas cópias do gene *ansB* nas bactérias *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7. C- (1) e C-(2) são o resultado da PCR de colônia das *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7 não produtoras de L-Asparaginase II, respectivamente. As colunas 1 a 7 são resultantes da PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo integrativo contendo uma cópia do gene *ansB* (1 a 3 referentes à *B. subtilis* KO7 e 4 a 7 à *B. subtilis* $\Delta 6$). De 8 a 13 são os fragmentos obtidos na PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo contendo duas cópias do gene *ansB* (8 a 10 correspondem a *B. subtilis* KO7 e 11 a 13 a *B. subtilis* $\Delta 6$). As transformações foram confirmadas pela presença das bandas de 1340bp nas colunas 1 a 7 e 2.735bp nas colunas 8 a 13.



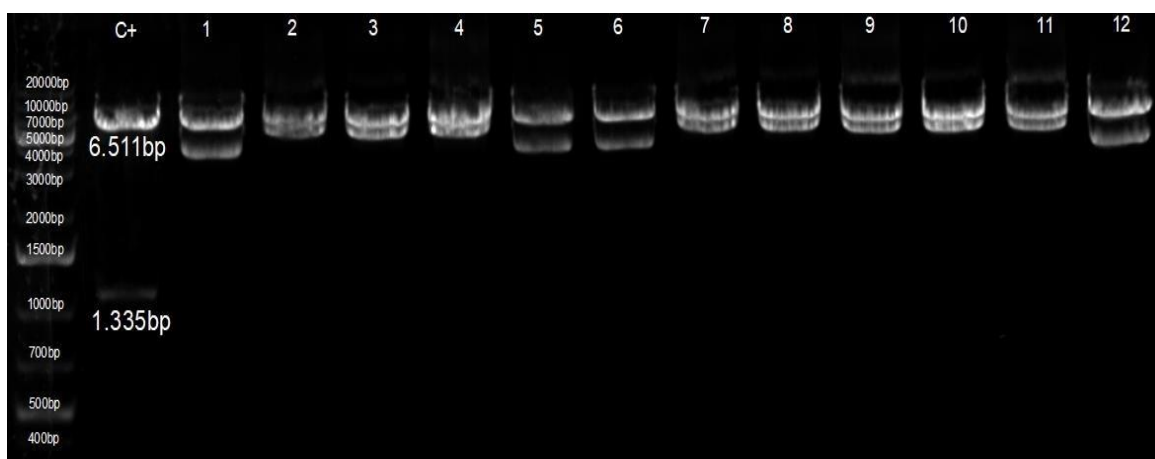
Fonte: Autora (2020).

Na figura, C-(1) e C-(2) correspondem à PCR de colônia da *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7, respectivamente, não produtoras de L-Asparaginase II, ou seja, que não possuem o gene *ansB* integrado ao seu genoma. Os números do 1 ao 3 representam os produtos das PCRs de colônias resultantes da transformação do pBS1K-*ansB* (uma cópia) em *B. subtilis* KO7, do 4 ao 7 são fragmentos resultantes da mesma reação, porém de colônias de *B. subtilis* $\Delta 6$. Os números 8 ao 10 são resultados das PCRs de colônias de *B. subtilis* KO7 transformadas com o pBS1K-2x(*ansB*) (duas cópias) e do 11 ao 13 são os fragmentos das PCRs de colônias obtidas na transformação do mesmo plasmídeo em *B. subtilis* $\Delta 6$.

É possível visualizar que todas as colônias selecionadas e testadas apresentaram o fragmento de correspondente ao produto da PCR de uma cópia do gene codificador da L-Asparaginase II (1 ao 7) e duas cópias deste mesmo gene (8 ao 13), exceto os controles negativos. Portanto, foi estocada uma colônia positiva de cada transformação e iniciou-se o processo de clonagem de quatro cópias do *ansB* no pBS1K (pBS1K-4x(*ansB*)), sendo

que cada cópia contém o promotor, RBS e terminador de transcrição. A Figura 18 mostra o resultado do teste da clonagem dessas 4 cópias na *E. coli* JM109, sendo o pBS1K-*ansB* utilizado como controle.

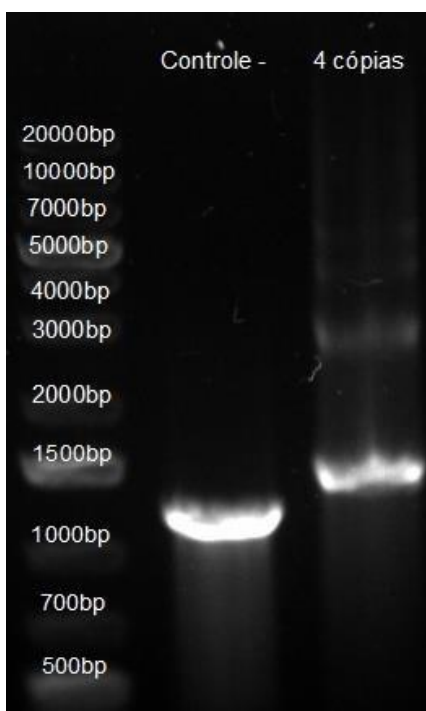
Figura 18: Fragmentos obtidos na digestão pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* dos plasmídeos extraídos da *E.coli* JM109 resultantes da clonagem de quatro cópias do *ansB* no plasmídeo pBS1K. C+ consistiu no pBS1K-*ansB* (plasmídeo com uma cópia do gene *ansB*). As colunas 2 a 4 e 7 a 11 correspondem a plasmídeos que contém os fragmentos esperados para a digestão do pBS1K-4x(*ansB*), sendo estes de tamanho 6.511bp (plasmídeo digerido) e 5.431bp (quatro cópias da unidade de transcrição do *ansB*). Dessa forma, concluiu-se que estes plasmídeos eram positivos e, portanto o número 9 foi selecionado para dar continuidade no processo e ser inserido em *B. subtilis*.



Fonte: Autora (2020).

De acordo com a Figura 18, os plasmídeos 2 ao 4 e 7 ao 11 apresentaram o fragmento com o tamanho correspondente ao pBS1K digerido (6.511bp) e às quatro cópias do gene *ansB* (5.431bp). Com o objetivo de melhorar a visualização e confirmar a clonagem, uma vez que os fragmentos resultantes da digestão possuem tamanhos muito próximos, foram desenhados um primer *foward* e outro *reverse* específicos para o plasmídeo, para amplificar apenas o fragmento correspondente a quatro cópias do gene *ansB* através de PCR. A reação foi realizada utilizando o plasmídeo número 9 como molde e o resultado da eletroforese em gel de agarose do produto da mesma encontra-se na Figura 19.

Figura 19: Resultado da PCR para testar a clonagem de quatro cópias do gene *ansB*. A reação resultou em diversos fragmentos não específicos, sendo que o esperado era apenas um fragmento de 5.400bp, o que dificultou a confirmação da integração das quatro cópias do gene *ansB* ao genoma da bactéria *B. subtilis*. A confirmação foi realizada pelo teste de degradação do amido descrito posteriormente.



Fonte: Autora (2020).

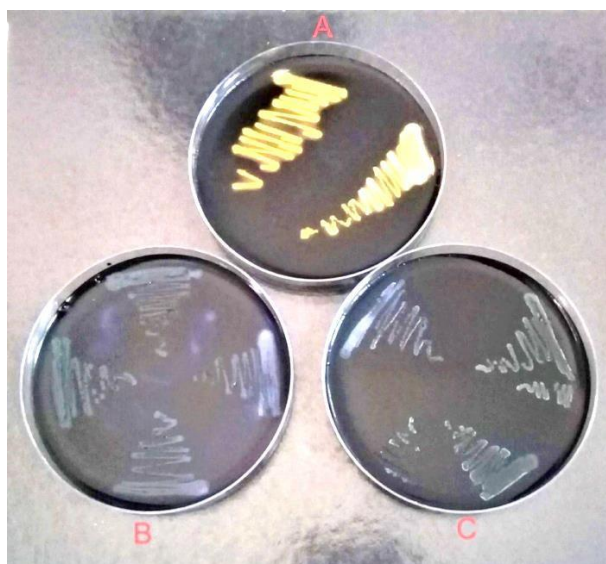
O controle negativo da PCR consistiu no plasmídeo pBS1K- RFP, o qual não contém o gene *ansB*, e sim o gene que codifica a Proteína Vermelho Fluorescente (RFP do inglês *Red Fluorescent Protein*). A figura demonstra que a PCR das quatro cópias do gene que codifica a L-Asparaginase II não funcionou, uma vez que deveria ter resultado em um fragmento de aproximadamente 5.400bp enquanto apresentou vários fragmentos não específicos.

Baseado no resultado da digestão do plasmídeo, optou-se por dar continuidade ao processo de clonagem e foi realizada a transformação, em *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7, do plasmídeo contendo as quatro cópias do gene *ansB* confirmado pela digestão pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* (Figura 18). Porém, a confirmação da transformação não pôde ser realizada por PCR de colônia devido à falta de especificidade da reação, como demonstrada pela Figura 19.

Para confirmar a integração de uma, duas e quatro cópias do gene que codifica a L-Asparaginase II em *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7, as colônias foram cultivadas em

placas de LB sólido suplementado com amido para testar a sua capacidade de degradação do amido. O controle negativo consistiu nas *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7 não produtoras de L-Asparaginase II e capazes de degradar amido cultivadas em placas de LB sólido com amido. O resultado obtido, após a adição de iodo aos cultivos, encontra-se na Figura 20.

Figura 20: Teste de degradação do amido. A placa A consiste no cultivo dos controles negativos *B. subtilis* $\Delta 6$ e *B. subtilis* KO7 não produtores de L-Asparaginase II e capazes de degradar amido. As placas B e C correspondem a colônias de *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* $\Delta 6$, respectivamente, que possuem uma, duas e quatro cópias do gene *ansB*. A ausência da cor azul ao redor das colônias na placa A significa que o amido foi degradado pelas bactérias, ao contrário do que ocorreu nas placas B e C em que a cor azul das colônias indica a presença de amido, o que permite concluir que as bactérias não estão produzindo amilase e, portanto, apresentam o gene *ansB* integrado ao seu genoma no locus *amyE*.



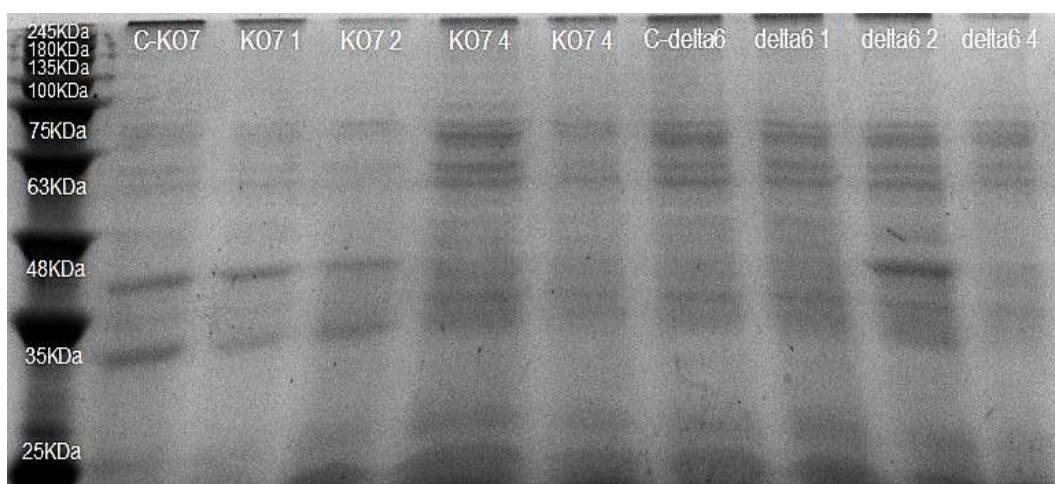
Fonte: Autora (2020).

A placa A representa os controles negativos que degradam amido. A letra B corresponde ao cultivo das colônias de *B. subtilis* KO7 contendo uma e duas cópias do *ansB* confirmadas por PCR de colônia e de duas colônias resultantes da integração de quatro cópias deste gene no genoma da bactéria e que não foram confirmadas por PCR. A placa C é resultante do cultivo de *B. subtilis* $\Delta 6$ com uma e duas cópias do gene *ansB* também confirmadas por PCR de colônia e de uma colônia contendo as quatro cópias do

gene e que não foi confirmada por PCR. A cor azulada dos cultivos nas placas B e C indica que há amido no meio, uma vez que este reage com o iodo (adicionado após o cultivo) formando um complexo de cor azul. Isto não é observado ao redor das colônias do controle, pois o amido próximo a elas foi degradado pela amilase produzida pelas mesmas.

Este resultado confirma que as colônias resultantes da transformação dos plasmídeos integrativos pBS1K-*ansB* e pBS1K-2x(*ansB*) e pBS1K-4x(*ansB*) perderam o gene que codifica a amilase. Considerando os resultados das digestões dos plasmídeos e das PCRs de colônia, é possível afirmar que este gene foi substituído por uma, duas e quatro cópias do gene *ansB* controlado pelo promotor P_{veg} . A produção da L-Asparaginase II pelas linhagens transformadas foi testada pela corrida em gel de poli(acrilamida) SDS-PAGE do sobrenadante resultante do rompimento celular após o cultivo destas bactérias e o resultado encontra-se na Figura 21. O marcador de peso molecular aplicado foi o BLUeye Prestained Protein Ladder (Sigma-Aldrich).

Figura 21: Teste de expressão da L-Asparaginase II de *A. fischeri* por *B. subtilis*. Observa-se os resultados dos extratos resultantes do rompimento celular das células obtidas nos cultivos das bactérias *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* $\Delta 6$ que possuem uma (KO7 1 e delta6 1), duas (KO7 2 e delta6 2) e quatro (KO7 4 e delta6 4) cópias do gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri* integradas ao seu genoma no locus *amyE*, além dos controles negativos (C-KO7 e C-delta6) que consistem nas *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* $\Delta 6$ não transformadas com plasmídeos integrativos contendo o gene *ansB*.



Fonte: Autora (2021).

De acordo com a Figura 21, o único cultivo que apresentou uma banda próxima dos 37,5 kDa e que não estava presente no controle foi o da linhagem de *B. subtilis* $\Delta 6$ contendo duas cópias do gene da L-Asparaginase II integradas ao seu genoma (delta6 2). Com isso, foi realizado o teste de atividade utilizando do extrato celular após o rompimento das células por sonicação. Os resultados foram comparados com o controle negativo (*B. subtilis* $\Delta 6$ não produtora de L-Asparaginase II de *A. fischeri*) e estão na Tabela 4:

Tabela 4: Valores de proteínas totais, atividade e atividade específica resultantes dos ensaios com o extrato celular dos cultivos do controle negativo (*B. subtilis* $\Delta 6$ não produtora de L-Asparaginase II) e da bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ contendo duas cópias da unidade de transcrição do gene da L-Asparaginase II de *A. fischeri*.

Amostra	Proteínas totais (mg/L)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Controle	3260,42 $\pm$		
Negativo	160,15	0,00066 $\pm$ 0,00012	1,190E-05
<i>B. subtilis</i> $\Delta 6$	3178,61 $\pm$		
(2xansB)	622,73	0,00074 $\pm$ 0,00008	1,363E-05

Fonte: Autora (2021).

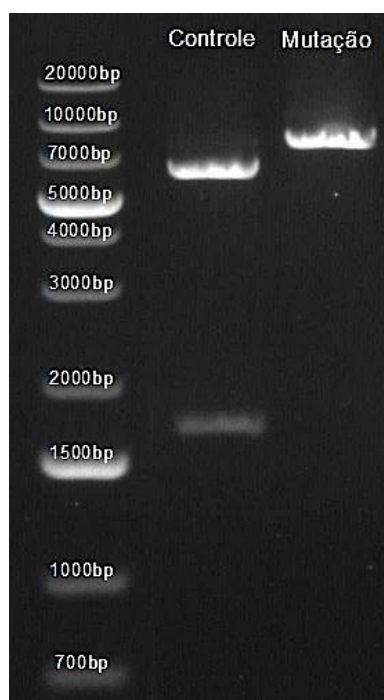
De acordo com a tabela, a bactéria *B. subtilis* $\Delta 6$ contendo o pBS1K-2x(ansB) não foi capaz de produzir a L-Asparaginase II, uma vez que a atividade específica para esta enzima foi similar à do controle negativo. Portanto, concluiu-se que a integração do gene ansB ao genoma da bactéria não é uma estratégia interessante para a obtenção de altos níveis de produção da enzima L-Asparaginase II, mesmo aumentando o número de cópias da unidade de transcrição do gene.

4.3. Sistema de exportação de proteínas por *B. subtilis*.

Após a construção do sistema de produção heterólogo da L-Asparaginase de forma intracelular, procedeu-se para a construção de um sistema de exportação eficiente de proteínas a ser aplicado para a L-Asparaginase. A primeira etapa para a construção do sistema de exportação de proteínas consistiu na remoção do sítio de reconhecimento da *BsaI* do plasmídeo pBS1C através da mutação sítio-dirigida. A Figura 22 apresenta o resultado da digestão pelas enzimas *EcoRI* e *BsaI* do plasmídeo que passou pela mutação (pBS1C(A4481T)) e do controle negativo (pBS1C não mutado). Os fragmentos esperados

no controle negativo eram de 5.591bp e 1.583bp, enquanto esperava-se apenas o fragmento referente ao plasmídeo linear (7.174bp) resultante da mutação.

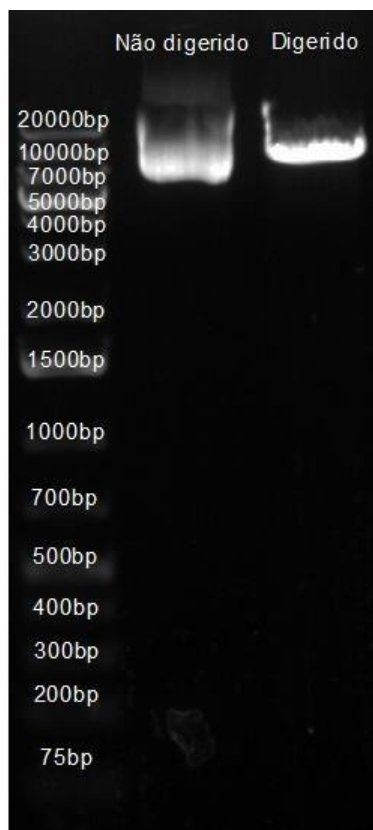
Figura 22: Digestão do pBS1C(A4481T) (mutação) pelas enzimas *EcoRI* e *BsaI*, utilizando como controle negativo o plasmídeo pBS1C não modificado. De acordo com a figura, o controle negativo apresentou os fragmentos esperados de 5.591bp e 1.583bp. Além disso, a presença de apenas um fragmento de 7.174bp resultante da digestão do plasmídeo mutado indica que este deixou de apresentar o sítio de reconhecimento da *BsaI*, com isso, que a mutação sítio-dirigida funcionou.



Fonte: Autora (2019).

A Figura 22 demonstra que a digestão pela *BsaI* do controle negativo e do plasmídeo resultante da mutação apresentaram os fragmentos esperados. Dessa forma, concluiu-se que a mutação sítio-dirigida foi bem-sucedida, possibilitando a continuação do trabalho. O plasmídeo foi então usado para inserção do promotor e do gene da GFP (-ATG), obtendo o pBS1C(A4481T)-Plux3.2-sfGFP (-ATG). A Figura 23 representa o resultado da digestão pela enzima *BsaI* do plasmídeo resultante desta clonagem, com o objetivo de confirmar a presença dos sítios de reconhecimento desta enzima inseridos juntos com o promotor e o gene da GFP e, com isso, analisar se a clonagem funcionou.

Figura 23: Digestão do pBS1C(A4481T)-Plux3.2-sfGFP (-ATG) pela enzima de restrição *BsaI*. É possível observar que o fragmento resultante da digestão apresenta 7.982bp referente ao plasmídeo digerido pela enzima indicando que o sítio da *BsaI* foi inserido o que significa que a clonagem funcionou.



Fonte: Aluna (2019).

De acordo com a figura, o sítio de reconhecimento da enzima *BsaI* foi adicionado ao plasmídeo, pois a digestão pela enzima gerou o fragmento de 7.982bp referente ao plasmídeo linear. Isto indica sucesso da clonagem, uma vez que a ligação do promotor e do gene da GFP ao plasmídeo resulta na adição de dois sítios da *BsaI*. A figura 24 apresenta o resultado do sequenciamento do plasmídeo.

Figura 24: Alinhamento entre a sequência esperada para o pBS1C(A4481T)- Plux3.2-sfGFP (-ATG) (Seq1) e a fornecida pelo sequenciador (Seq2) em duas regiões diferentes. A) Está representada a sequência indutora em rosa e o começo do Plux3.2 em roxo. B) É possível observar o final do Plux3.2 (roxo), os dois sítios de restrição da *BsaI* (vermelho) e o gene da GFP (verde).

A)

Seq_1	6721	CAGCAATAGAGCGATTTTAAAGCGTATTAAAGTTCCTTGTCATCGTATTGGAGACAAAG	6780
Seq_2	632	CAGCAATAGAGCGATTTTAAAGCGTATTAAAGTTCCTTGTCATCGTATTGGAGACAAAG	691
Seq_1	6781	AAATTCATGTATTAGGTGATACTAAATCGG-TTGTATTGTCTATGCCTATTAAATGAACAG	6839
Seq_2	692	AAATTCATGTATTAGGTGATACTAAATCGGGTTGTATTGTCTATGCCTATTAAATGAACAG	751
Seq_1	6840	TTTAAAAAGCAGTCTTAAATCATCATCATCATCACTAACTAGAACCCATCTCTTT-	6898
Seq_2	752	TTTAAAAA-GCAGTCTTAAATCATCACCATCATCATCACTAACTAGAACCCATCTCTTT	810
Seq_1	6899	AT-CCTTACCTATTGTTTGTGCGCAAGTTTGGCGTGTTATATATCATTAAAAACGGTAATAG	6957
Seq_2	811	ATCCCTTACCTATTGTTG-----	829

B)

Seq_1	7021	GTTTAAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTACGCAAGAAAATGGTTTGTGTATA	7080
Seq_2	144	-----GTATA	148
Seq_1	7081	ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACTGAGACCTActagAGGGTCTCAGT	7140
Seq_2	149	ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACTGAGACCTACTAGAGGGTCTCAGT	208
Seq_1	7141	TTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAATTTGGTTGAATTGGATGGTGA	7200
Seq_2	209	TTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAATTTGGTTGAATTGGATGGTGA	268
Seq_1	7201	TGTTAATGGTCATAAATTTTCTGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACATACGGTAA	7260
Seq_2	269	TGTTAATGGTCATAAATTTTCTGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACATACGGTAA	328

Fonte: Alinhamento realizado no *software* SerialCloner 2.6.1.

Na figura 24, é possível observar o promotor Plux3.2, o gene da GFP e os sítios de restrição da *BsaI*, o que demonstra que a clonagem funcionou e o pBS1C(A4481T)-Plux3.2-sfGFP (-ATG) foi construído com sucesso. Portanto, iniciou-se a etapa de clonagem das sequências codificadoras dos oito peptídeos-sinal a fim de obter uma biblioteca de peptídeos-sinal. A transformação da biblioteca de peptídeos-sinal ao plasmídeo na proporção 1:50 (plasmídeo:inserto) resultou em três colônias de *E. coli*

fluorescentes na placa colocada sob luz azul. Desta transformação, foram coletadas 9 colônias, incluindo as três que apresentaram fluorescência, as quais tiveram seu plasmídeo extraído e sequenciado.

O alinhamento entre as sequências fornecidas pelo sequenciador e as codificadoras dos peptídeos-sinal demonstrou que cinco dos plasmídeos extraídos possuíam a sequência de um peptídeo-sinal, sendo estes: NucB, NucB*, PhoB, AmyE e WapA^w (Figuras 25 e 26). O NucB* apresentou algumas mutações em relação à sequência do NucB, possivelmente geradas durante o processo de clonagem. Além disso, os peptídeos PhoB, AmyE e WapA^w sequenciados tiveram algumas diferenças quando alinhados com a sequência esperada para cada um, nesse caso, provavelmente, devido à baixa resolução do sequenciamento.

Figura 25: Alinhamento entre as sequências esperadas (Seq1) para o NucB e as fornecidas pelo sequenciamento (Seq2) dos plasmídeos resultantes da biblioteca de peptídeo-sinal. Em azul está representado o RBS, em vermelho o peptídeo-sinal e em verde o gene que codifica a GFP. O peptídeo-sinal identificado está indicado em cada alinhamento

NucB

```
Seq_1 7081 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAA-TGGATGGCGGGACT 7139
          |||
Seq_2 147 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAAATGGATGGCGGGACT 206

Seq_1 7140 GTTTCCTGGCGGCGGCGGTGCTGCTGTGTCTGATGGTGCCGCAACAAATTCAAGGAGCGTC 7199
          |||
Seq_2 207 GTTTCCTGGCGGCGGCGGTGCTGCTGTGTCTGATGGT--CGCAACAAATTCAAGGAGCGTC 264

Seq_1 7200 ATCATATGACAAA GTTTCCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGG--TGTTGTTCCAATTTT 7256
          |||
Seq_2 265 ATCATATGACAAA--TTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTTGTTCCTCAATTT 322
```

NucB*

```
Seq_1 7078 ATAATAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAATGGAT--GGCGG 7135
          |||
Seq_2 221 ATAATAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACA----TGAAAAATGGGATGGGCGG 166

Seq_1 7136 GACTGTTCCTGGCGGCGGCGGTGCTGCTGTGTCTGATGGTGCCGCAACAAATTCAAGGAG 7195
          |||
Seq_2 165 GACTGTTCCTGGCGGCGGCGGTGCTGCTGTGTCTGATGGTGCCGCAACAAATTCAAGGAG 106

Seq_1 7196 CGTCATCATATGACAAA GTTTCCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAATTT 7255
          |||
Seq_2 105 CGTCATCATATGACAAAGTTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAATTT 46
```

Fonte: Alinhamento realizado no *software* SerialCloner 2.6.1.

Figura 26: Alinhamento entre as sequências esperadas (Seq1) para o PhoB, AmyE e WapA^w e as fornecidas pelo sequenciamento (Seq2) das sequências obtidas da biblioteca de peptídeos-sinal. Em azul está representado o RBS, em vermelho o peptídeo-sinal e em verde o gene que codifica a GFP. O peptídeo-sinal identificado está indicado em cada alinhamento

PhoB

```
Seq_1 7081 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAATTTCCGAAAAAACTG 7140
          |||
Seq_2 149 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAATTTCCGAAAAA-CTG 207

Seq_1 7141 CTGCCGATTGCGGTGCTGTCAATTCGCTTTTCATCACTGGCGTCAGGAT-CAGTGCC 7199
          |||
Seq_2 208 CTGCCGATTGCGGTGC-GT-CATCAATGCG-TTTCATCACTGGCGTCAG-ATCAAGTGCG 263

Seq_1 7200 GGAAGCGTCAGCGCAAGAAAAA GTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCC 7259
          | |||
Seq_2 264 G--AGCGTCAGCGCAAGAAAA-----GTTCT 287
```

AmyE

```
Seq_1 7081 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGTTTGCGAAAAGATTAAAAACA 7140
          |||
Seq_2 146 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGTTTGCGAAAAGATTAAAAACA 205

Seq_1 7141 TCACTGCTGCCGCTGTTTGCGGGATTCTGCTGCTGTTTCACTGGTGCTGGCGGGACCG 7200
          |||
Seq_2 206 TCACTGCTGCCGCTGTTTGCGGGATTCTGCTGC-----CT----- 241

Seq_1 7201 GCGGCGGCGTCAGCGGAACAGCG GTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGG-TGTTGT 7259
          |||
Seq_2 242 -----GTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGT 277
```

WapA^w

```
Seq_1 7081 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAAGAAAAAGAAG-AAA 7139
          |||
Seq_2 148 ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAAGAAAAAGAAGGAAA 207

Seq_1 7140 CTTTAAAAGATTATTGCGGCGTTTCTGGTGCTGGCGCTGATGATTTCACTGGTGCCGGC 7199
          | |||
Seq_2 208 C-----AGATTATTGCGGCGTTTCTGGTGCTGGCGCTGATGATTTCACTGGTGCCGGC 261

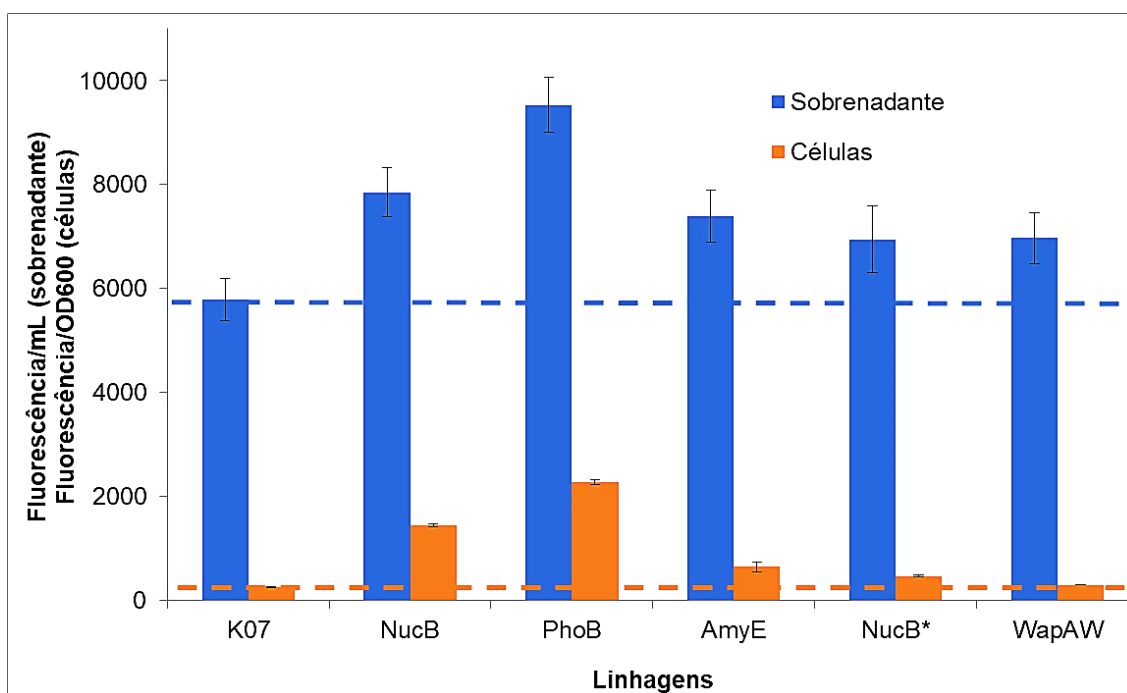
Seq_1 7200 GGACGTGCTGGCGAAATCAACA GTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCC 7259
          |||
Seq_2 262 GGACGTGCTGGCGAAATCAACAGTTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCC 321
```

Fonte: Alinhamento realizado no *software* SerialCloner 2.6.1.

Com isso, os plasmídeos contendo os peptídeos-sinal foram inseridos em *B. subtilis* KO7. A Figura 27 mostra os resultados de fluorescência do sobrenadante e das

células do cultivo das colônias de *B. subtilis* KO7 contendo cada um dos peptídeos-sinal identificados e do cultivo da *B. subtilis* KO7 não produtora de GFP (controle negativo). O valor de fluorescência das células foi normalizado pela OD_{600nm} para fins de correção em função da quantidade de células. A fluorescência do sobrenadante foi normalizada pelo volume adicionado a placa para a leitura (200 µL).

Figura 27: Fluorescência do sobrenadante (azul) e das células (laranja) dos cultivos de *B. subtilis* KO7 contendo cada peptídeo-sinal identificado e do controle negativo (*B. subtilis* KO7 não produtora de GFP). É possível observar que todos os cultivos das linhagens contendo peptídeo-sinal apresentaram sobrenadante com valor de fluorescência maior que o controle negativo indicando a exportação da GFP. O peptídeo-sinal que resultou na exportação mais eficiente foi o PhoB (fluorescência do sobrenadante 1,65 vezes maior que o controle).



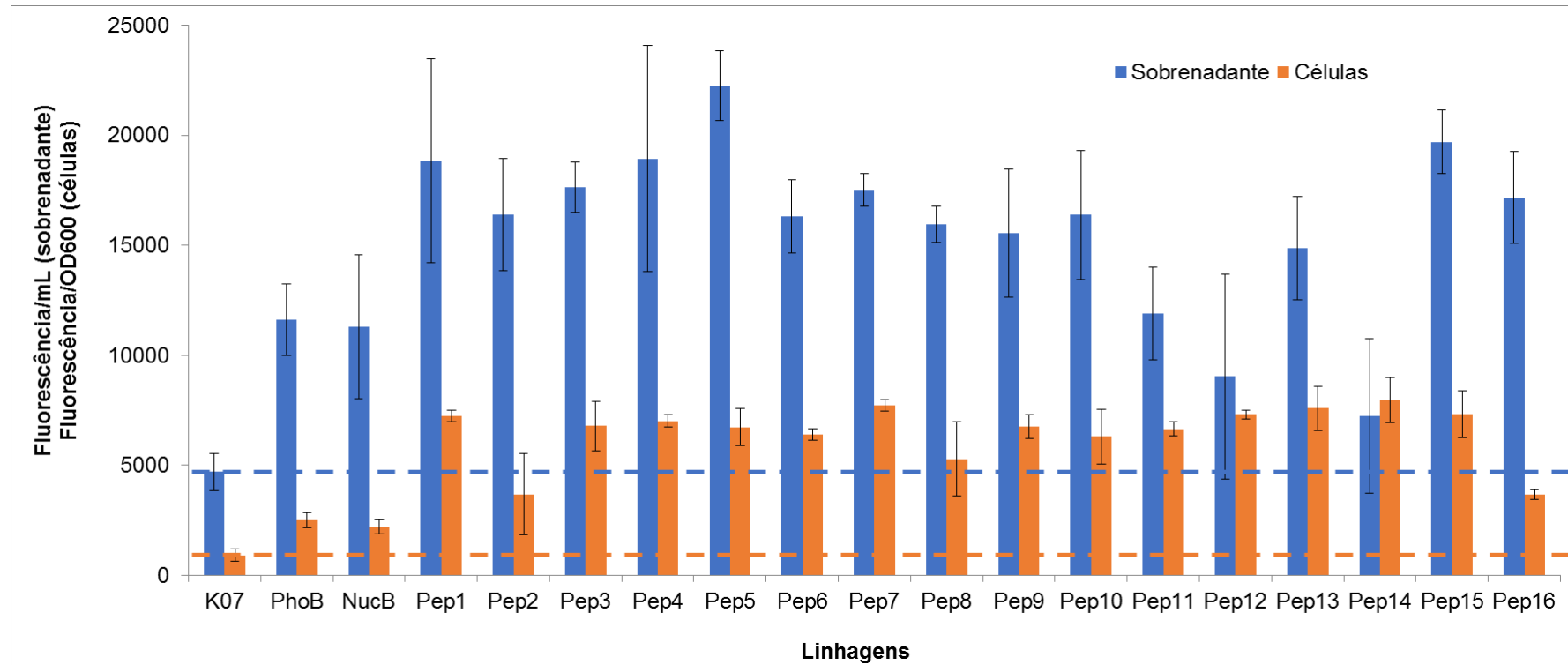
Fonte: Autora (2020).

De acordo com o gráfico, é possível observar que todos os sobrenadantes das culturas que contêm peptídeo-sinal apresentaram fluorescência maior que o controle, indicando que a GFP está sendo produzida e exportada para o meio extracelular. O sobrenadante do cultivo da *B. subtilis* KO7 que possui o PhoB foi o que resultou no maior valor de fluorescência, sendo 1,65 vezes maior que o controle negativo (comparação entre as médias das fluorescências). Na sequência, o sobrenadante do cultivo da colônia que

contêm o NucB apresentou fluorescência 1,36 vezes maior que o controle. Além disso, as células de todos os cultivos, exceto pelo WapA^w, tiveram fluorescência maior que o controle, demonstrando a presença da GFP.

Com isso, foi realizada uma nova clonagem da mistura de sequências de peptídeos-sinal com o intuito de obter clones com novos peptídeos-sinal e encontrar um que promovesse uma exportação ainda mais efetiva da proteína repórter. A Figura 28 mostra os resultados de fluorescência do sobrenadante e das células resultantes do cultivo das colônias de *B. subtilis* KO7 geradas após nova rodada de clonagem dos peptídeo-sinal. Além destas, foram cultivadas as colônias que contêm os peptídeos-sinal NucB e PhoB obtidas e testadas anteriormente. A fim de facilitar a incubação e a análise, que foram dificultadas pelo grande número de amostras, os cultivos foram realizados em 400 µL de Meio Power suplementado com cloranfenicol em microtubos de 2,0 mL. O controle negativou consistiu na *B. subtilis* KO7 não produtora de GFP (cultivada nas mesmas condições, porém na ausência de antibiótico) e a fluorescência das células foi normalizada pela OD_{600nm} e do sobrenadante pelo volume usado na leitura (100 µL).

Figura 28: Fluorescência do sobrenadante (azul) e das células (laranja) dos cultivos de *B. subtilis* KO7 produzindo GFP fusionada a um peptídeo-sinal e do controle negativo (*B. subtilis* KO7 não produtora de GFP). De acordo com os resultados, é possível concluir que os peptídeos-sinal promoveram a exportação da GFP para o meio extracelular uma vez que os sobrenadantes dos cultivos das linhagens com peptídeo-sinal apresentaram fluorescência maior que o controle negativo. O sobrenadante do cultivo da linhagem Pep5 obteve o maior valor de fluorescência quando comparado com o controle (4,44 vezes).



Fonte: Autora (2020).

Quando comparados com o controle, os cultivos das bactérias contendo peptídeo-sinal resultaram em sobrenadantes com maiores valores de fluorescência, o que significa que os peptídeos promoveram a exportação da GFP. O sobrenadante do cultivo da colônia Pep5 foi o que apresentou o maior valor, sendo 4,44 vezes a fluorescência do controle (comparação entre as médias das fluorescências). O cultivo da linhagem Pep5 resultou no segundo maior valor (4,75 vezes), seguido pelos cultivos Pep 15 (4,20 vezes) e Pep4 (4,04 vezes). Além disso, as células de todos os cultivos resultaram em fluorescência superior as células do controle, indicando a produção da GFP.

Foram observados alguns problemas com a qualidade do sequenciamento dos peptídeos-sinal obtidos nesta segunda biblioteca, entretanto, de acordo com os resultados, concluiu-se que as colônias Pep1 a Pep15 possuem o peptídeo-sinal NucB (Figura 29), uma vez que o sequenciamento forneceu as mesmas sequências e o melhor alinhamento obtido foi com o este peptídeo, e a Pep16 (Figura 30) contém o LipA.

Figura 29: Seq1 consiste na sequência esperada e Seq2 na fornecida pelo sequenciador. Em azul está representado o RBS, em vermelho a sequência do NucB e em verde o gene que codifica a GFP. O sequenciamento dos plasmídeos extraídos da Pep 1 a Pep15 forneceu as mesmas sequências as quais obtiveram o melhor alinhamento com o NucB.

```

Seq_1  7081  ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAATGGATGGCGGGACTG  7140
          |||
Seq_2  143    ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAAAATGGATGGCGGGAC--  200

Seq_1  7141  TTTCTGGCGGCGGCGGTGCTGCTGTGTCTGATGGTGCCGCAACAAATTCAAGGAGCGTCA  7200
Seq_2  201  -----  200

Seq_1  7201  TCATATGACAAAATTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAATTTTGGTT  7260
          |||
Seq_2  201  -----CTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAATTTTGGTT  244

Seq_1  7261  GAATTGGATGGTGATGTTAATGGTCATAAATTTCTGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGAT  7320
          |||
Seq_2  245  GAATTGGATGGTGATGTTAATGGTCATAAATTTCTGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGAT  304

Seq_1  7321  GCTACATACGGTAAATTGACATTGAAATTTATTTGTACAACTGGTAAATTGCCAGTTCCT  7380
          |||
Seq_2  305  GCTACATACGGTAAATTGACATTGAAATTTATTTGTACAACTGGTAAATTGCCAGTTCCT  364

```

Fonte: Alinhamento realizado no *software* SerialCloner 2.6.1.

Figura 30: Alinhamento entre a sequência esperada para o LipA (Seq1) e a sequenciada a partir do DNA extraído da colônia Pep16 (Seq2). Em azul está o RBS, em vermelho a sequência do LipA e em verde o gene da GFP.

```

Seq_1  7081  ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAATTTGTGAAAAGAAGAATT  7140
          |||||
Seq_2  147    ATAAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAAACATGAAATTTGTGAAAAGAAGAATG  206

Seq_1  7141  ATTG-CGCTGGTGACAATTCTGATGCTGTCAGTGACATCACTGTTTGCCTGCAACCGTC  7199
          || |||  | ||||  |||  | | || |
Seq_2  207    G-TGCCGCCAA-CAAAATTCAGGAGCGTCCATCATATGACAAA-----  248

Seq_1  7200  AGCGAAAGCGGCGGAACACGTTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAAT  7259
          |||||
Seq_2  249  -----GTTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGGTGTTGTTCCAAT  289

Seq_1  7260  TTTGGTTGAATTGGATGGTGATGTTAATGGTCATAAATTTTCTGTTTCTGGTGAAGGTGA  7319
          |||||
Seq_2  290  TTTGGTTGAATTGGATGGTGATGTTAATGGTCATAAATTTTCTGTTTCTGGTGAAGGTGA  349

```

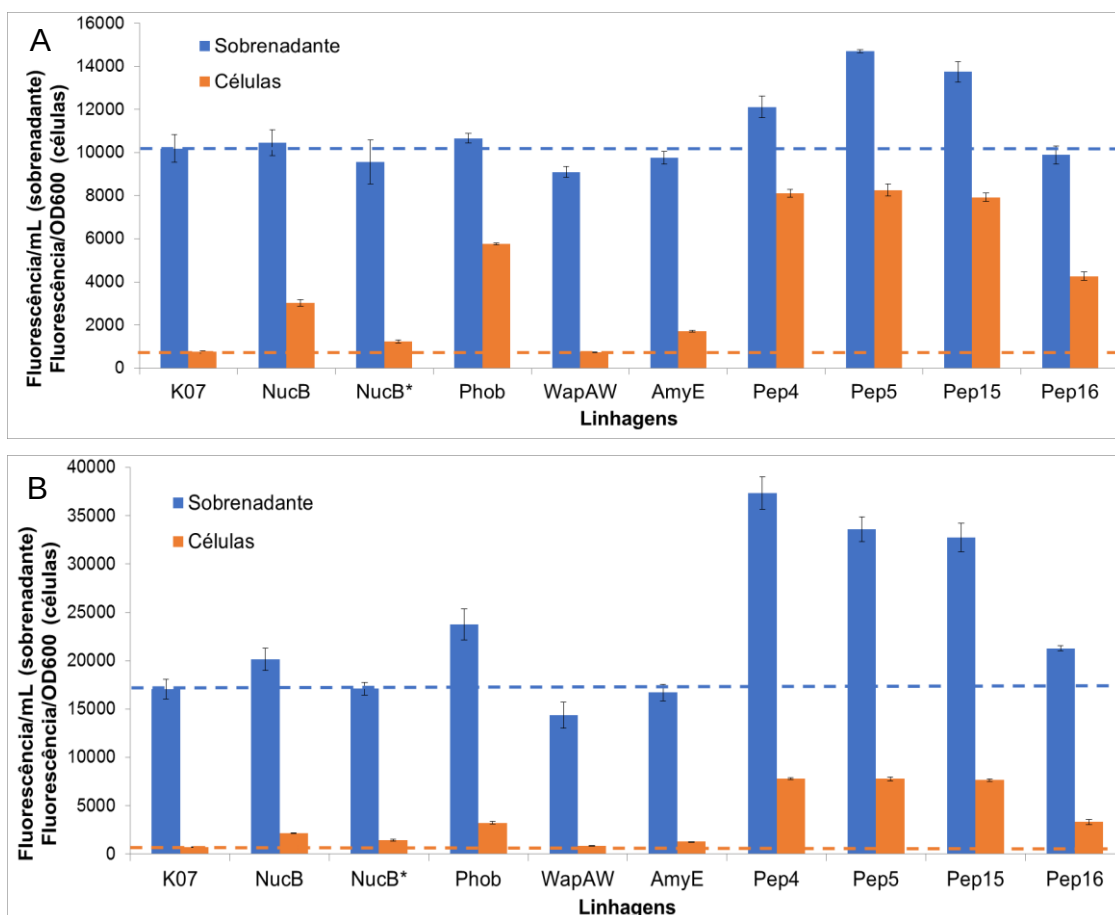
Fonte: Alinhamento feito no SerialCloner 2.6.1.

Interessante observar aqui que o NucB utiliza do sistema Sec de exportação, enquanto que o LipA utiliza o sistema Tat de exportação. Verifica-se assim, que uma exportação de alta eficiência pode ser obtida com qualquer um dos dois sistemas.

Devido às condições do cultivo em microescala, foi observado um erro elevado nas medidas, uma vez que a agitação e aeração provavelmente foram prejudicadas. Para confirmar estes resultados, as três colônias contendo o NucB cujo cultivo apresentou os sobrenadantes com os maiores valores de fluorescência (Pep4, Pep5, Pep15) e a Pep16 que possui o LipA foram cultivadas em uma escala maior (5 mL de meio em tubos de ensaio). Além destas, as linhagens obtidas na primeira biblioteca também foram novamente cultivadas nas mesmas condições a fim de fornecer uma melhor comparação entre os resultados. Foram retiradas amostras após 12 e 24 horas de cultivo para a análise de produção e exportação da GFP.

A Figura 31 apresenta os resultados de fluorescência dos sobrenadantes (normalizada pelo volume 200 µL) e das células (normalizada pela OD_{600nm}) resultantes dos cultivos.

Figura 31: Fluorescência das células e dos sobrenadantes após 12h (A) e 24h (B) de cultivo das linhagens obtidas a partir das duas bibliotecas de peptídeo-sinal construídas neste trabalho e do controle negativo (*B. subtilis* K07 não produtora de GFP). Em azul está representada a fluorescência do sobrenadante e em laranja a fluorescência das células.



Fonte: Aluna (2021).

Os resultados mostram que, após 12h de cultivo, os sobrenadantes das linhagens contendo os peptídeos-sinal Pep4, Pep5 e Pep15 já apresentavam fluorescência maior que o controle. Após 24h do início do cultivo, a fluorescência dos sobrenadante dos cultivos das linhagens Pep4, Pep5 e Pep15 aumentou ainda mais em relação ao controle. Também, os peptídeos-sinal PhoB e Pep16, que não haviam funcionado ainda em 12h, apresentaram fluorescência nos sobrenadantes após 24h. Dentre todos, o Pep4, referente ao peptídeo-sinal NucB, foi o que apresentou o maior valor de fluorescência no sobrenadante. É possível verificar também que a fluorescência intracelular da maioria dos cultivos se manteve constante de 12 a 24h. A fluorescência intracelular do Pep4, por exemplo, manteve-se em torno de 8000 ua/OD₆₀₀. Isso indica que a eficiência da exportação se mantém constante, sendo a fluorescência celular, muito provavelmente, resultado de

proteínas recém-sintetizadas que não tiveram tempo ainda de passar pelo transporte. Por outro lado, o peptídeo PhoB promoveu uma redução da fluorescência intracelular associada ao aumento da fluorescência extracelular em 24h comparado à 12h. Esse resultado mostra que PhoB apresenta baixa eficiência de exportação inicialmente, aumentando a eficiência com o passar do cultivo.

Após esse teste, concluiu-se que o peptídeo-sinal NucB (Pep4) promoveu a exportação mais efetiva da proteína repórter. Dessa forma, repetiu-se o sequenciamento para identificação deste peptídeo através do alinhamento com as sequências de todos os oito peptídeos-sinal utilizados na construção da biblioteca. O melhor alinhamento foi idêntico ao representado na Figura 29. Considerando que a linhagem contendo este peptídeo está exportando a GFP para meio extracelular e que resultou em fluorescência maior que as linhagens contendo o NucB obtidas na primeira biblioteca, concluiu-se que há alta probabilidade de que este alinhamento incompleto com o NucB seja resultado de um problema na resolução do sequenciamento. Além disso, as diferenças entre os valores de fluorescência dos cultivos Pep4, Pep5 e Pep15, todos identificados como NucB, é pequena, sendo facilmente explicada pelo fato de que são colônias diferentes. É esperado que sejam observadas alterações nos níveis de produção de proteínas, uma vez que duas linhagens não são perfeitamente idênticas (DECLERCK, 2012). O fato do NucB ter sido recuperado em 17 de 21 colônias selecionadas por fluorescência já indicava alto potencial para esse peptídeo-sinal na exportação proteica. Assim, o NucB foi selecionado para uso na construção de um sistema de exportação da L-Asparaginase.

Em uma análise da literatura, foram encontrados outros trabalhos que, assim como este, consistiram na construção de bibliotecas de peptídeos-sinal para avaliação de eficiência de exportação de proteínas repórteres em *Bacillus subtilis* e escolha do peptídeo mais eficiente. Dentre eles, ZHANG, *et al.*, (2013), testou 114 peptídeos-sinal do sistema Sec e 24 do Tat para a exportação da enzima Xilanase por *Bacillus subtilis*. Dentre os 138 peptídeos, os pertencentes ao sistema Sec foram os que geraram a exportação mais efetiva da enzima, especialmente o PhoB e o NucB, o que corrobora com os resultados obtidos no desenvolvimento deste projeto. Com relação aos peptídeos-sinal pertencentes ao sistema Tat, o LipA foi o mais efetivo sendo que os outros deste sistema não foram capazes de exportar a enzima (incluindo o WapA^W e o YwbN).

Além disso, WANG *et al.*, (2020) também testou diferentes peptídeos-sinal em *Bacillus subtilis* e utilizou a Transglutaminase como repórter. O peptídeo que resultou na melhor exportação foi o YncM (também testado por ZHANG, *et al.*, (2013)) pertencente

ao sistema Sec. É importante ressaltar que o NucB e o PhoB não foram testados neste trabalho. Entre os peptídeos do sistema Tat estavam o LipA, o WapA^w e o YwbN. O LipA teve eficiência 69% menor que o YncM, enquanto o WapA^w e o YwbN foram os que resultaram na menor eficiência de exportação. Considerando os resultados de ZHANG, *et al.* (2013) e de exportação da GFP apresentados na Figura 31, provavelmente o NucB e o PhoB apresentariam eficiência maior que o YncM se tivessem sido aplicados para a exportação Transglutaminase.

Portanto, conclui-se que os resultados obtidos no desenvolvimento deste projeto estão em concordância com os resultados de outros trabalhos nos quais os peptídeos-sinal do sistema Sec geraram a exportação proteica mais efetiva, especialmente o NucB e o PhoB. Além disso, o LipA foi o peptídeo-sinal do sistema Tat que apresentou maior eficiência quando comparado com os demais, porém ainda foi menos eficiente que os peptídeos-sinal do sistema Sec. Ademais, de acordo com a literatura e os resultados deste trabalho, o WapA^w é um dos peptídeos-sinal que apresenta a menor eficiência de exportação.

4.4. Construção do sistema de exportação da L-Asparaginase II

Como não havia nenhum plasmídeo disponível que fosse adequando à construção do sistema de exportação de L-Asparaginase II de *A. fischeri*, foi construído um plasmídeo replicativo em *B. subtilis* através da técnica Golden Gate. A Figura 32 mostra a bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo resultante deste processo (pBSECK-RFP) e cultivada em LB líquido suplementado com canamicina. A resistência ao antibiótico e o *pellet* de coloração rosa indicam a presença dos genes de resistência a canamicina e da RFP significando que a ligação entre as partes foi bem-sucedida. A RFP foi inserido no novo plasmídeo como marcadora de clonagem.

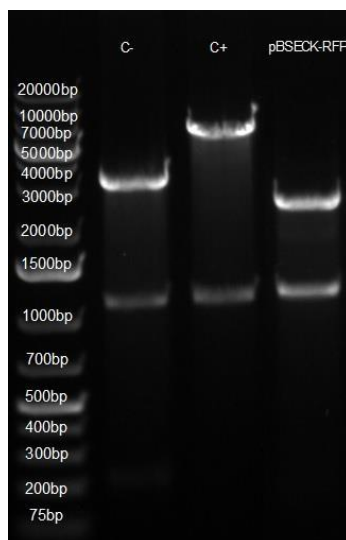
Figura 32: Colônias de *E.coli* JM109 transformadas com o plasmídeo pBSECK-RFP. A coloração rosa indica a presença da RFP.



Fonte: Autora (2021).

Com isso, o plasmídeo extraído desta bactéria foi digerido pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* e os fragmentos resultantes foram observados por eletroforese em gel de agarose, assim como o resultado da digestão do controle negativo (não possui o gene da RFP) e do controle positivo (possui o gene que codifica a RFP) pelas mesmas enzimas. O resultado é mostrado na Figura 33.

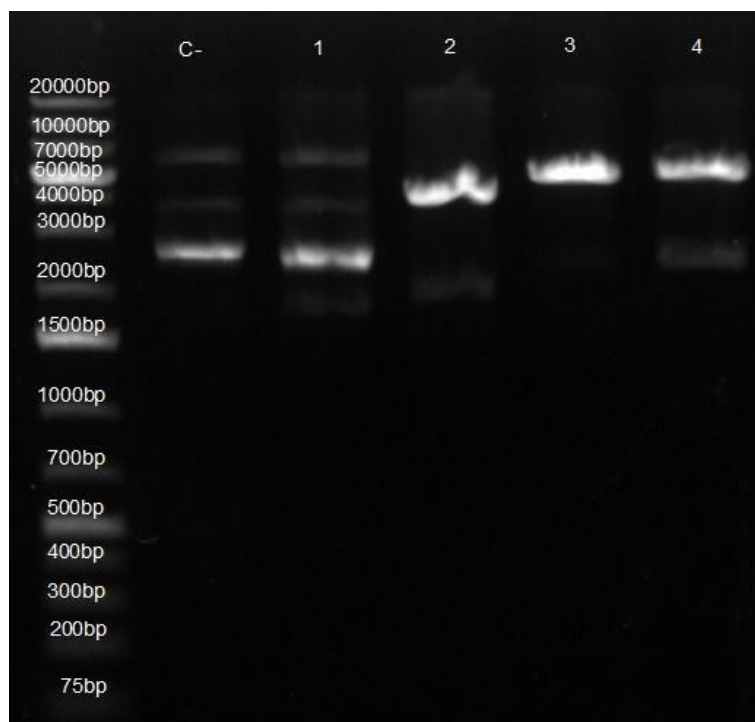
Figura 33: Fragmentos obtidos nas digestões com *EcoRI* e *PstI* para confirmar a presença do gene da RFP no plasmídeo pBSECK-RFP. Como esperado, a digestão do controle negativo resultou nos fragmentos de 3.243 bp, 1.119 bp e 208 bp e a do controle positivo apresentou os fragmentos de 6.068bp (plasmídeo digerido) e 1.106bp (gene que codifica a RFP). A digestão do plasmídeo extraído da *E. coli* JM109 resultante da transformação da reação do Golden Gate também resultou nos fragmentos de tamanho esperado (2.405 bp do plasmídeo digerido e 1.106 bp do gene da RFP).



Fonte: Autora (2021).

De acordo com a Figura 33, foi confirmada a presença do gene da RFP no plasmídeo extraído da *E. coli* transformada com o plasmídeo criado, uma vez que foram observados os fragmentos do tamanho esperado (2.405 bp referente ao plasmídeo digerido e 1.106 bp correspondente ao gene da RFP) após a digestão. A digestão do molde utilizado para a amplificação do gene de resistência a canamicina (controle negativo) resultou nos fragmentos de 3.243 bp, 1.119bp e 208 bp e a digestão do controle positivo gerou os fragmentos de 6.068 bp (plasmídeo digerido) e 1.106 bp (gene que codifica a RFP). Dessa forma, deu-se continuidade para a construção do sistema de exportação da L-Asparaginase. A Figura 34 apresenta o padrão de bandas em gel de agarose resultante da digestão pela *BsaI* dos plasmídeos extraídos de *E. coli* após a transformação da ligação entre o pBSECK e o gene *ansB* (-ATG):

Figura 34: Resultado da digestão pela *BsaI* dos plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* TOP10 (1 ao 4) transformadas com a ligação entre o pBSECK e o gene que codifica a L-Asparaginase II (sem o códon inicial). O controle negativo consistiu no plasmídeo pBSECK-RFP o qual não possui o sítio de reconhecimento da *BsaI*. A digestões dos plasmídeos 2 ao 4 resultaram no fragmento de tamanho esperado (4.634 bp).



Fonte: Autora (2021).

Observou-se que os plasmídeos 2 ao 4 (Figura 34) foram linearizados (resultando num fragmento de 4.634 bp) e, portanto, apresentam o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *BsaI* indicando que a sequência promotora e o gene que codifica a L-Asparaginase II foram inseridos no pBSECK. Após o sequenciamento, foi comprovado que o plasmídeo número 4 possui os 2 sítios desta enzima, assim como a região promotora e o gene *ansB* (-ATG), como está demonstrado na Figura 35. Com isso, o plasmídeo passou a ter a denominação pBSECK-*ansB*(-ATG).

Figura 35: Alinhamento entre a sequência esperada para o pBSECK-*ansB*(-ATG)(Seq1) e a fornecida pelo sequenciador (Seq2). Em azul está o RBS, em vermelho estão representados os dois sítios de reconhecimento da *BsaI* e o gene que codifica a L- Asparaginase II de *A. fischeri* está em rosa.

```

Seq_1  3420  AAATGTAGTAGATTAACTAATAAGGAGGACAACTGAGACCTActagAGGGTCTCAAAAA 3479
          |||
Seq_2  149   AAATGTAGTAGACTAACTAATAAGGAGGACACACTGAGCCCTACTAGAGGGTCTCAAAA- 207

Seq_1  3480  AGAATGCCATTGCAGTAGGTATGTTGCTTTCTGGTCTTTGCTTTAGCTCAATCAGTCTTG 3539
          |||
Seq_2  208   -GAATGCCATTGCAGTAGGTATGTTGCTTTCTGGTCTTTGCTTTAGCTCAATCAGTCTTG 266

Seq_1  3540  CTGATGATTTACCAAATATTAAATCTTAGCGACTGGCGGTACTATTGCTGGCGCAGGTC 3599
          |||
Seq_2  267   CTGATGATTTACCAAATATTAAATCTTAGCGACTGGCGGTACTATTGCTGGCGCAGGTC 326

Seq_1  3600  AATCCGCAACAGGTTCTAGCTATACATCTGGTAAAGTTGGAGTCGATTCTTTGATTCAIG 3659
          |||
Seq_2  327   AATCCGCAACAGGTTCTAGCTATACATCTGGTAAAGTTGGAGTCGATTCTTTGATTCAIG 386

```

Fonte: Autora (2021).

A partir desta construção, será possível inserir o peptídeo-sinal NucB entre o RBS e o gene *ansB* substituindo os sítios de reconhecimento da *BsaI* e, com isso, testar a exportação da L-Asparaginase II pela bactéria *B. subtilis*.

5. Conclusões

Neste trabalho, foi desenvolvida uma linhagem de *B. subtilis* produtora de L-Asparaginase II de *A. fischeri* no meio intracelular. Para isto, foi utilizado um promotor induzível por xilose o qual não foi capaz de reprimir a produção desta proteína na ausência deste açúcar, o que não prejudicou o crescimento da bactéria. Dessa forma, as demais construções foram feitas com promotores constitutivos.

Uma estratégia adotada e testada foi a integração de uma, duas e quatro cópias do gene que codifica a L-Asparaginase II de *A. fischeri* no genoma da *B. subtilis* Δ6 e *B. subtilis* KO7, permitindo a obtenção de uma linhagem geneticamente estável produtora desta enzima. Porém, a enzima não foi produzida em quantidade significativa pela bactéria, e, portanto, esta abordagem não foi adotada.

Além disso, foi construída e testada uma biblioteca de peptídeos-sinal utilizando a GFP como proteína repórter. A partir dos resultados com a biblioteca, foi selecionado o peptídeo que gerou a exportação proteica mais efetiva, sendo este o NucB.

Por fim, foi criado um plasmídeo propício para a construção de um sistema de expressão da L-Asparaginase em fusão com peptídeo-sinal.

Dessa forma, conclui-se que este projeto forneceu a base necessária para tornar possível a construção de uma plataforma bacteriana para a produção e exportação de proteínas terapêuticas.

6. Referências bibliográficas

ASSEMBLY Scars. Disponível em: <<https://parts.igem.org/Help:Assembly/Scars>>.

Acesso em: 09 de agosto de 2020.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA. Disponível em: <<https://amb.org.br/noticias/mpf-recomenda-suspensao-de-compra-e-distribuicao-da-asparaginase-chinesa-amb-e-cfm-apoiam-decisao/>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2021.

Automated design of mutagenic primers for site-directed mutagenesis. Disponível em: <https://www.bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/DNA_1.cgi> Acesso em: 11 de agosto de 2020.

CASTRO, D.; MARQUES, A. S. C.; ALMEIDA, M. R.; DE PAIVA, G. B.; BENTO, H. B. S.; PEDROLI, D. B.; FREIRE, M. G.; TAVARES, A. P. M.; SANTOS-EBINUMA, V. C. L-Asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 4515-4534, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11359-y.

CHAND, S.; MAHAJAN, R. V.; PRASAD, J. P.; SAHOO, D. K.; MIHOOLIYA, K. N.; DHAR, M. S.; SHARMA, G. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 619-647, 2020. DOI: 10.1002/bab.1888.

CORRÊA, G.G.; LINS, M. R. C. R.; SILVA, B. F.; DE PAIVA, G. B.; ZOCCA, V. F. B.; RIBEIRO, N. V.; PICHELI, F. P.; MACK, M.; PEDROLI, D. B. A modular

autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 326-334, 2020. DOI: 10.1016/j.ymben.2020.03.012.

COSTA, I. M.; SCHULTZ, L.; PEDRA, B. A. B.; LEITE, M. S. M.; FARSKY, S. H. P.; OLIVEIRA, M. A.; PESSOA, A.; MONTEIRO, G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Nature - Scientific Reports**, v. 6, Article number: 36239, 2016. DOI: 10.1038/srep36239.

CUI, W.; HAN, L.; SUO, F.; LIU, Z.; ZHOU, L.; ZHOU, Z. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, Article number: 145, p. 144-154, 2018. DOI: 10.1007/s11274-018-2531-7.

DECLERCK, P. J. Biologicals and biosimilars: a review of the science and its implications. **Generics and Biosimilars Initiative Journal**, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2012. DOI: 10.5639/gabij.2012.0101.005.

FENG, Y.; LIU, S.; JIAO, Y.; GAO, H.; WANG, M.; DU, G.; Chen, J. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, n. 4, p. 1509-1520, 2017. DOI: 10.1007/s00253-016-7816-x.

SERGIO, M.; CRISTIANE, S.; FERRAZ, M. I. Biofármacos no brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento. Brasília: Ipea, 2018. (Texto para Discussão, n. 2398).

FREUDL, R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. **Microbial Cell Factories**, v. 17, Article number: 52, 2018. DOI: 10.1186/s12934-018-0901-3.

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

HIJIYA, N.; SLUIS, I. M. V. D. Asparaginase-Associated Toxicity in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Taylor & Francis Group, Leukemia & Lymphoma**, v. 57, n. 4, p. 748-757, 2016. DOI: 10.3109/10428194.2015.1101098.

iGEM EVRY PARIS-SACLAY. GOLDEN GATE ASSEMBLY PROTOCOL. Disponível em: <<http://2017.igem.org/Team:Hamburg/GGProtocoll>>. Acesso em: 20 de maio de 2021.

KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 306-322, 2018. DOI: 10.1002/bab.1617.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 720-737, 2016. DOI: 10.3109/1040841X.2015.1022505.

LIU, Y.; LIU, L.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Synthetic Biology Toolbox and Chassis Development in *Bacillus subtilis*. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 548-562, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.005.

LOUREIRO, A. C.; SÁ, S. K. G.; NOGUEIRA, D. M.; COMAPA, S. S.; SANTOS B. M.; PEREIRA, M. M.; SOUZA, A. Q. L.; NASCIMENTO, B. R. V. Estudo em alimentos cotidianos: Pesquisa de polissacarídeos através da reação com iodo. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 24243-24253, 2019. DOI: 10.34117/bjdv5n11-111.

MARILLONNET, S.; GRÜTZNER, R. Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 130, e115, 2020. DOI: 10.1002/cpmb.115.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/29718-seis-laboratorios-atestam-l-asparaginase-adquirida-pelo-ministerio-da-saude>>. Acesso em: 01 de março de 2020.

MORIMOTO, T.; KADOYA, R.; ENDO, K.; TOHATA, M.; SAWADA, K.; LIU, S.; OZAWA, T.; KODAMA, T.; KAKESHITA, H.; KAGEYAMA, Y. Enhanced

Recombinant Protein Productivity by Genome Reduction in *Bacillus subtilis*. **DNA Research**, v. 15, p. 73-81, 2008. DOI: 10.1093/dnares/dsn002.

NGUYEN, H. A.; SU, Y.; LAVIE, A. Design and Characterization of *Erwinia Chrysanthemi* l-Asparaginase Variants with Diminished l-Glutaminase Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 34, p. 17664-76, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.728485.

SALZER, W.; BOSTROM, B.; MESSINGER, Y.; PERISSINOTTI, A. J.; MARINI, B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 59, n. 8, p. 1797-1806, 2018. DOI: 10.1080/10428194.2017.1386305.

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

PARKER, M.; LI, Z. Biotechnology and drugs. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 23. ed. Adeboye Adejare, 2020. cap 22, p. 397-415. 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-820007-0.00022-2.

PHAN, T. T. P.; NGUYEN, H. D.; SCHUMANN, W. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 167-72, 2012. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.10.006.

PIÑERO, S. L. **Clonagem, expressão e caracterização molecular de L-asparaginases de origem micobacteriana visando o desenvolvimento de um novo biofarmáco para o tratamento de Leucemia Linfóide Aguda**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2018.

POPP, P. F.; DOTZLER, M.; RADECK, J.; BARTELS, J.; MASCHER, T. The *Bacillus* BioBrick Box 2.0: expanding the genetic toolbox for the standardized work with *Bacillus subtilis*. **Nature Scientific Reports**, v. 7, Article number: 15058, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-15107-z.

PUETZ, J.; WURM, F. M. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. **MDPI, Open Access Journals**, v. 7, n. 8, p. 476-485, 2019. DOI: 10.3390/pr7080476.

RADECK, J.; KRAFT, K.; BARTELS, J.; CIKOVIC, T.; DURR, F.; EMENEGGER, J.; KELTERBORN, S.; SAUER, C.; FRITZ, G.; GEBHARD, S.; MASCHER, T. The *Bacillus* BioBrick Box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. **Journal of Biobical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 29-45, 2013. DOI: 10.1186/1754-1611-7-29.

RAY, M.; ADHIKARI (Nee Pramanik), S.; KUNDU, P. Isolation and Characterization of Microbial Asparaginase to Mitigate Acrylamide Formation in Food. **Advances in Plant & Microbial Biotechnology. Springer, Singapore**, p. 95-100, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-6321-4_13.

REGISTRY OF STANDARD BIOLOGICAL PARTS. Disponível em: <<http://parts.igem.org/Help:Prefix-Suffix>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2020.

REUß, D. R.; THÜRMER, A.; DANIEL, R.; QUAX, W. J.; STÜLKE, J. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* strain $\Delta 6$. **Genome Annouce**, v. 4, n. 4, 2016. DOI: 10.1128/genomea.00759-16.

TAYLOR, S. The Past, Present, and Future of Recombinant DNA Technology. **Science Journal, Science Department Journal of Davenport University**, v.1, 2019.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. **Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update**. Blood Cancer Journal, Nature, v. 7, n. 6, 2017. DOI: 10.1038/bcj.2017.53.

KHAN, S.; ULLAH, M. W.; SIDDIQUE, R.; NABI, G.; MANAN, S.; YOUSAF, M.; HOU, H. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal of Genomics**, v. 2016, Article number: 2405954, 2016. DOI: 10.1155/2016/2405954.

TJALSMA, H.; BOLHUIS, A.; JONGBLOED, J. D. H.; BRON, S.; DIJL, J. M, V. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. **American Society for Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 515–547, 2000. DOI: 10.1128/mmbr.64.3.515-547.2000.

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

WANG, S.; YANG3, Z.; LI, Z.; TIAN, Y. Heterologous Expression of Recombinant Transglutaminase in *Bacillus subtilis* SCK6 with Optimized Signal Peptide and Codon, and Its Impact on Gelatin Properties. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 1082-1091, 2020. DOI: 10.4014/jmb.2002.02049.

WEBER E.; ENGLER C.; GRUETZNER R.; WERNER S.; MARILLONNET S. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0016765.

WELLS, E.; ROBINSON, A. S. Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. **Biotechnology Journal**, v. 12, Article number: 1600105, 2017. DOI: 10.1002/biot.201600105.

ZHANG, W.; YANG M.; YANG, Y.; ZHAN, J.; ZHOU, Y.; ZHAO, X. Optimal secretion of alkali-tolerant xylanase in *Bacillus subtilis* by signal peptide screening. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8745-56, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7615-4.

APÊNDICES

Apêndice A- Lista de oligonucleotídeos utilizados para as construções realizadas neste trabalho

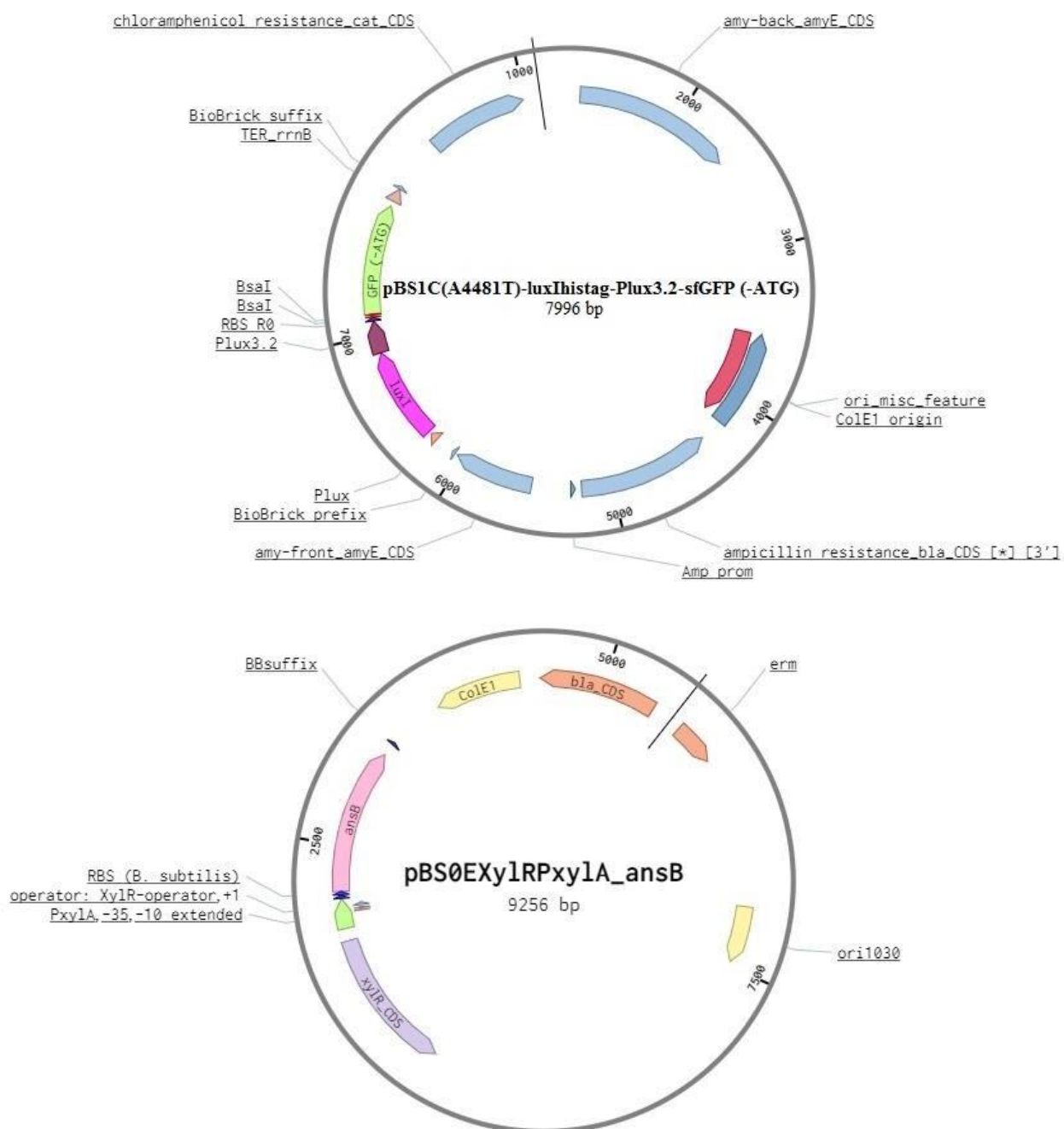
Nome	Sequência(5'-3')	TM(°C)	Finalidade
AmyE_fw (corrigido)	AAACATGTTTGCAGAAAAGATTTAAACATCACTGCTGCCGCTGTTTGC GGGATTTCTGCTGCTGTTTCACCTGGTGCTGGCGGGACCGCGGCG GCGTCAGCGGAAACAGCG	100,3	Construção da biblioteca de peptídeos-sinal
AmyE_rv (corrigido)	AAACCGCTGTTTCCGCTGACGCCGCCGCCGGTCCCGCCAGCACCA GGTGAAACAGCAGCAGAAATCCCGCAAACAGCGGCAGCAGTGATGT TTTAAATCTTTTCGCAAAACAT	100,2	
CotC_fw (corrigido)	AAACATGAAAAACAGACTGTTTATTCTGATTGCTTTTGCCTGATTTGC CTGTTTCTGTCAATTGGACAACCGTTTTTCCGTCAATGATTCTGACAG TGCAAGCGGCGAAATCAACAAGAAGA	93,1	
CotC_rv (corrigido)	AAACTCTTCTTGTGATTTCGCCGCTTGCACTGTCAGAATCATTGACG GAAAAACGGTTGTCCAAATGACAGAAACAGGCAATCAGCAAAAA GCAATCAGAATAAACAGTCTGTTTTTCAT	92,7	
LipA_fw (corrigido)	AAACATGAAATTTGTGAAAAGAAGAAATTATGCGCTGGTGACAATTCT GATGCTGTCAGTGACATCACTGTTTGCCTGCAACCGTCAGCGAAAG CGGCGGAACAC	95,2	
LipA_rv (corrigido)	AAACGTGTTCCGCCGCTTTTCGCTGACGGTTGCAGCGCAAAACAGTGAT GTCAGTGACAGCATCAGAATTGTCAACAGCGCAATAATCTTCTTTTC ACAAATTCAT	95,3	
NucB_fw (corrigido)	AAACATGAAAAATGGATGGCGGGACTGTTTCTGGCGGCGGCGGTG CTGCTGTGTCTGATGGTGCCGAACAAATTCAGGAGCGTCATCATA TGACAAA	97,7	
NucB_rv (corrigido)	AAACTTTGTCATATGATGACGCTCCTTGAATTTGTGCGGCACCATCA GACACAGCAGCACCGCCGCCGCCAGAAACAGTCCCGCCATCCATT TTTTTCAT	97,1	
Phob_fw (corrigido)	AAACATGAAAAAATTTCCGAAAAAACTGCTGCCGATTGCGGTGCTGT CATCAATTGCGTTTTTCATCACTGGCGTCAGGATCAGTGCCGGAAGCG TCAGCGCAAGAAAAA	96,6	
PhoB_rv (corrigido)	AAACTTTTTCTTGGCGTGACGCTTCCGGCACTGATCCTGACGCCAGT GATGAAAACGCAATTGATGACAGCACCGCAATCGGCAGCAGTTTTTT CGGAAATTTTTTCAT	96,1	
WapAW_fw (corrigido)	AAACATGAAAAAAGAAAAAGAAGAACTTTAAAGATTTATTGCGGC GTTTCTGGTGCTGGCGCTGATGATTTCAGTGGTGCCGCGGACGTGC TGCGGAAATCAACA	94	
WapAW_rv (corrigido)	AAACTGTTGATTTCCGCCAGCACGTCCGCCGGCACCAGTGAAATCATC AGCGCCAGCACCCAGAAACGCCGCAATAAATCTTTTAAAGTTCTTCTT TTCTTTTTTTTCAT	93,6	
YncM_fw (corrigido)	AAACATGGCGAAACCGCTGTCAAAGGAGGAATTCTGGTGAAAAAAG TGCTGATTGCGGGAGCGGTGGGAACAGCGGTGCTGTTTGAACACTG TCATCAGGAATCCGGGACTGCCGGCGGCGACGCGCAAGTGCGC	102,3	
YncM_rv (corrigido)	AAACCGCCACTTGCGCGTCCGCCGCCGGCAGTCCCGGAATTCCTGA TGACAGTGTTCCAAACAGCACCGCTGTTCCACCGCTCCCGCAATC AGCACTTTTTACCAGAAATCCTCCTTTTGACAGCGGTTTCGCCAT	102,2	
YwbN_fw (corrigido)	AAACATGTCAGACGAACAAAAAACCAGGAACAAATTCACAGAAGA GACATTCTGAAATGGGAGCGATGGCGGGAGCGGCGGTGGCGATTG GAGCGTCAGGACTGGGAGGACTGGCGCCGCTGGTGCAACAGCGG CGAAACCG	102	
YwbN_rv (corrigido)	AAACCGGTTTCGCCGCTGTTTGACACAGCGGCGCCAGTCTCTCCAG TCCTGACGCTCCAATCGCCACCGCCGCTCCCGCCATCGCTCCCAT TTCAGAAATGCTCTTCTGTGAATTTGTTCCGGTTTTTTTTGTTCTGTA CAT	101	
luxIhistag_Plux3.2(BBp)-fw	TGAGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTAAGTTTGTGCGAAGTTTGC G	63,5	Mutação sítio-dirigida
luxIhistag_Plux3.2- RBS(BBs-BsaI)-rv	TTAGCTGCAGCGGCCGCTACTAGTAGGTCTCAGTTTGTCTCCTTATT AGTTAATCTACTACATTTATATACAACAAACCATTTTC	58,9	
GFP(BBp-BsaI)-fw	TGAGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGGTCTCAGTTTCTAAAGGTGA AGAATTGTTTACAGG	61,8	
GFP(BBs-Term)-rv	TTAGCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATAAATACGTTTACAGTTTCTTC TTCATTTTTAACAAACAAAAACCCAGCTCATTGAGCTGGGTTTAAGC TGCTTGGCGGCCGCTCTACAGAAATGCGGACCTTGACTAG	61,2	
pBS1C(A4481T)_fw	GTGAGCGTGGGTACGCGGTATCATTTG	76	
pBS1C(A4481T)_rv	CAATGATACCGGTGACCCACGCTCAC	76	

Continuação do Apêndice A- Lista de oligonucleotídeos utilizados para asconstruções realizadas neste trabalho.

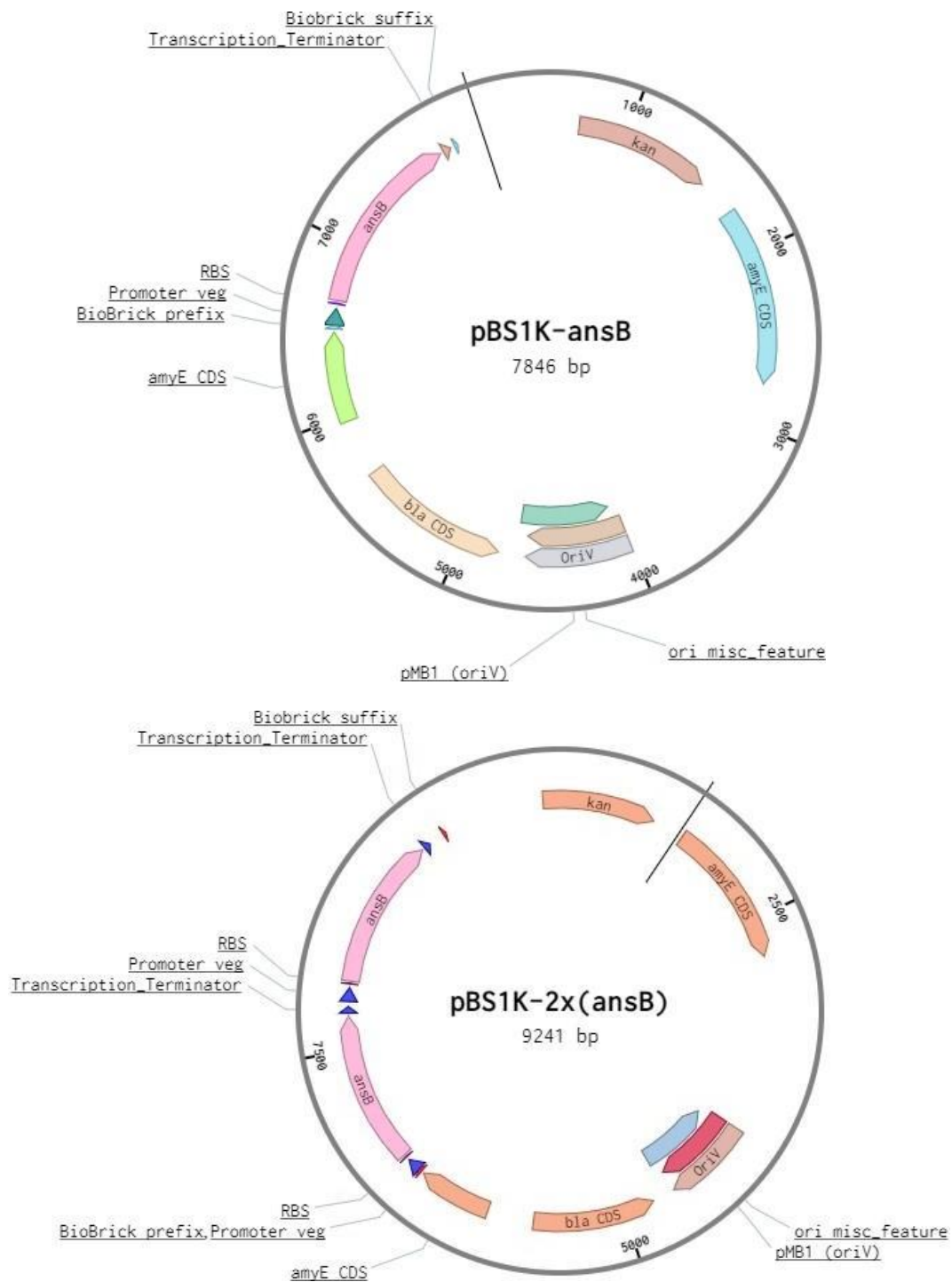
Nome	Sequência(5'-3')	TM(°C)	Finalidade
ansB-RBS (BBp)_fw	CTGAGGAATTCAAAAAAAAATTCTAGAGAGCTGATTAACATAAAGGAGGACAAACATGAAAAAGAATGCCATTGC	57,7	Sistema de expressão da L-Asparaginase intracelular
ansB (BBs)_rv	TTAGCTGCAGCGGCCGCTACTAGTACAACCTACATAAACATTTCATCCTTC	59,3	
ansB-(BBp)_fw	TGAGGAATTCAAAAAAAAATTCTAGAGATGAAAAAGAATGCCATTGC	57,7	Integração do gene ansB no cromossomo da bactéria <i>B. subtilis</i> e construção do sistema de expressão de L-Asparaginase II extracelular
Pveg_1	AGTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGAAATTTGTCAAATAATTTATTGACAACGCTTTATTAACGTTGATAC	70,5	
Pveg-tetO_4	ATATCTGCAGCGGCCGCTACTAGTAGTTTGTCTCTTATTAGTTAATCAC	59,9	
BBprefix_fw	ATGAGAATTCGCGGCCGCTTCTAG	61,3	Construção dos sistemas de expressão de L-Asparaginase II, da biblioteca de peptídeos-sinal e da exportação da L-Asparaginase II
BBsuffix_rv	CGGACTGCAGCGGCCGCTACTAG	66,7	
pJOE8999-pBS1C(Bsal)_fw	TTAGGGTCTCCTGCAGGAATGGCCATGACCAAAATCCC	66,6	Sistema de expressão da L-Asparaginase extracelular
pJOE8999-pBS0E(Bsal)_rv	TTAGGGTCTCTTGCTCTTGAAATCCCCTCAAAACCCG	66,1	
pBS0E-ori1030(Bsal)_fw	TTAGGGTCTCGGACAAGCATCTAATTCATAATCCCCAC	66,4	
pBS0E-ori1030 (Bsal)_rv	TTAGGGTCTCGCTTGAGAACGGCGGTAGATAAG	64,4	
pBS1C-pBS0E(Bsal)_fw	TTAGGGTCTCTCAAGCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAG	68,3	
pBS1C-pJOE8999(Bsal)_rv	TTAGGGTCTCCTGCAGCGGCCGCTACTAGTA	64,9	
luxIhistag_Plux3.2(BBs)-rv	GCAGCGGCCGCTACTAGTAGGTCTCAGTTTGTCTCCTTATTAGTTAATC	64,6	
ansB(BBp-Bsal)-fw	TGAGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGGTCTCAAAAAAGAATGCCATT	64,4	
NucB(ansB)_fw	AAACATGAAAAATGGATGGCGGGACTGTTTCTGGCGGGCGGGTGCTGCTGTCTGATGGTGCCGCAACAAATTCAAGGAGCGTCATCATA	97,7	
NucB(ansB)_rv	TTTTTTTGCATATGATGACGCTCCTTGAATTTGTTGCGGCACCATCAGACACAGCAGCACCGCCGCCGAGAAACAGTCCGCCATCCATTTTTCAT	97,2	
pBS1C-peptídeo-sinal-Seq_fw	CTTACCTATTGTTTGTGCGAAG	56,8	Sequenciamento de plasmídeos
pBS1C-peptídeo-sin-Seq(GFP)_rv	CGTATGTAGCATCACCTTCACC	59,5	
pBS1C-peptídeo-sin-Seq(ansB)_rv	CAGCAATAGTACCGCCAGTC	58,4	
pBS1K-fw	CTGGACACATGGAAACACAC	57,3	
pBS1K-rv	GCCGATGATAAGCTGTCAAAC	59,7	
pBS0E Seq_fw	GCGATATCCACTTCATCCACTC	60,9	
pBS0E Seq_rv	CGTTGGCCGATTCATTAATG	61,2	

Fonte: Autora (2021).

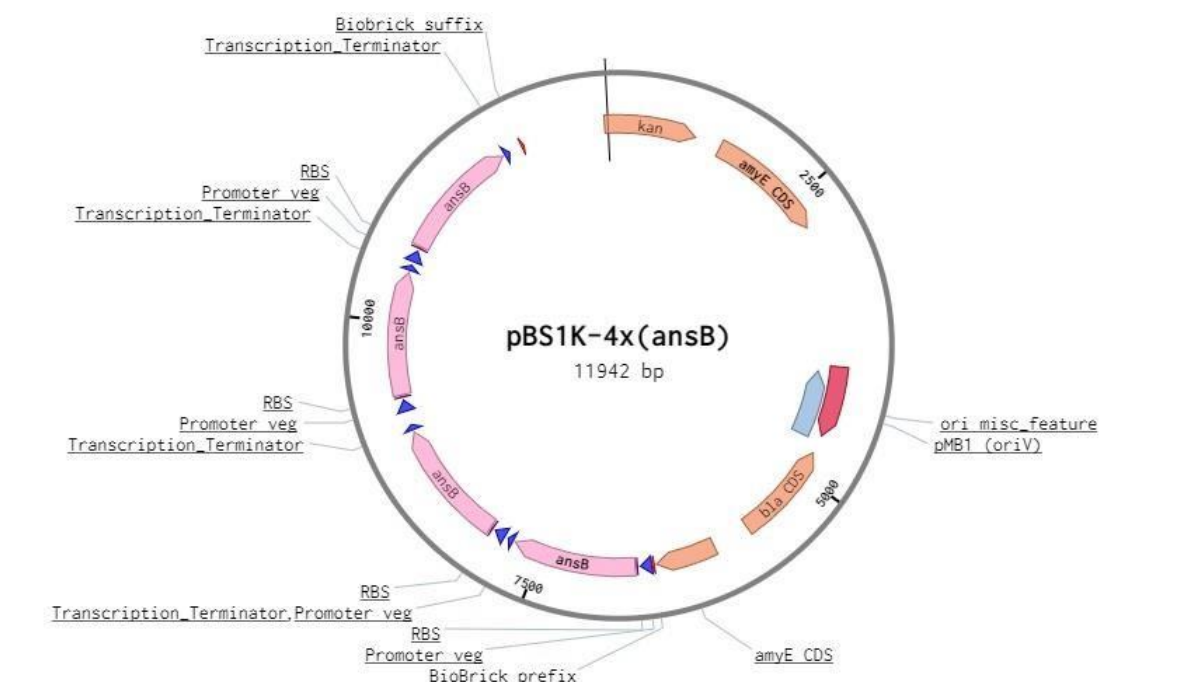
Apêndice B- Mapa dos plasmídeos utilizados na construção das bibliotecas de peptídeos-sinal e para a produção de L-Asparaginase II de *A. fischeri* intracelular pela bactéria *B. subtilis* sob controle do promotor induzível por xilose.



Apêndice C- Mapa dos plasmídeos construídos para integração de uma, duase quatro cópias do gene *ansB* de *A. fischeri* no genoma da bactéria *B. subtilis*.



Continuação do Apêndice C- Mapa dos plasmídeos construídos para integração de uma, duas e quatro cópias do gene *ansB* de *A. fischeri* no genoma da bactéria *B. subtilis*.



Fonte: Autora (2021).