RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **tese** será disponibilizado somente a partir de 25/07/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS

Reprogramação do metabolismo de purina na bactéria *Bacillus subtilis* por tecnologia de pequenos RNAs não codificadores (sRNAs)

ARARAQUARA, SP
2019

MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS

Reprogramação do metabolismo de purina na bactéria *Bacillus subtilis* por tecnologia de pequenos RNAs não codificadores (sRNAs)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp/Araraquara, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli

ARARAQUARA, SP
2019

L759r

Lins, Milca Rachel da Costa Ribeiro.
Reprogramação do metabolismo de purina na bactéria *Bacillus subtilis* por tecnologia de pequenos RNAs não codificadores (sRNAs) / Milca Rachel da Costa Ribeiro Lins. – Araraquara, 2019.
109 f. : il.

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

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Purinas. 3. Riboflavina. 4. Riborregulação. 5. *Riboswitch*. 6. RNAs reguladores. 7. RNAs sintéticos. 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

MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS

Reprogramação do metabolismo de purina na bactéria *Bacillus subtilis* por tecnologia de pequenos RNAs não codificadores (sRNAs)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp/Araraquara, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli

Data da defesa: ___/___/____

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Orientador(a): Profa. Danielle Biscaro Pedrolli (UNESP, Araraquara)

Membro Titular: Dra. Aline Silva Romão-Dumaresq (SENAI CETIQT, Rio de Janeiro)

Membro Titular: Prof. Dr. Adilson José da Silva (UFSCar, São Carlos)

Membro Titular: Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha (UNESP, Araraquara)

Membro Titular: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira (UNESP, Araraquara)

Local: Universidade Estadual Paulista UNESP – Campus de Araraquara, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara – São Paulo

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu guia, meu escudo e minha luz. À Ele toda honra e glória!

Aos meus pais, Marcos e Ana, minha base, meu alicerce, minha fortaleza, meu refúgio. Obrigada por me ensinar desde pequena o caminho da educação e o poder que ela tem de transformar as pessoas. Obrigada pelo o esforço de sempre me proporcionar o possível!

Às minhas irmãs, Maressa (Mara) e Ana Rafaela (Galega), meu amores, minhas amigas, minhas companheiras. Em todos os momentos vocês estiveram presentes (fisicamente ou em pensamento) e eu sei que vocês continuarão. Mara, a pessoa mais inteligente que eu conheço!! Galega, a pessoa mais "gaiata" da face da terra!! Amo vocês!!

À minha grande família materna e paterna. Amo cada virtude e cada defeito. Em especial, queria dizer ao meu primo-irmão, onde quer que ele esteja, que eu o amo demais. Não tive mais a oportunidade de te abraçar quando voltei do doutorado sanduíche (e isso ainda me consome bastante). Eu te amo, Adriel! E sempre amarei...

Ao gaúcho mais incrível que eu conheci na vida, Rômulo, o artista e filósofo. Bah, tu me "disse" uma vez que, as vezes, o que projetamos pra o futuro não acontece porque o destino resolve interferir. Fico feliz dele ter interferido tanto, a ponto de te conhecer lá do outro lado do mundo. O futuro a gente vai construindo...

À minha querida orientadora, Danielle, que com muita paciência e paixão me ensinou o que significava a biologia sintética e o que era possível fazer com ela. Você é uma pessoa a qual me espelho para continuar nessa jornada dentro da academia e na pesquisa. Agradeço também à Gerson, seu esposo, que nos ajudou bastante na mudança para a Alemanha, facilitando (e muito) a nossa vida lá! Obrigada!

Às cidades as quais vivi: Recife, Araraquara e Mannheim. Faço isso porque me proporcionaram momentos inesquecíveis que foram importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. Mas o que faz essas cidades tão especiais? Os amigos que fiz. Pessoas maravilhosas que me ajudaram a enfrentar problemas seja na mudança física mesmo, seja na vida pessoal me dando força quando eu mais precisava. Eu amo todos vocês!!!!

Às pessoas que compõem ou fizeram parte do laboratório mais maravilhoso da UNESP em Araraquara (Lab Synbio). Graci, Gabi, Vi, Flavinho (melhor técnico de todos), Nathanzinho, Patrick, Paulinho, Victor, Carol, Rafa, Laurinha, Russo, Bruna, Mariana, Joyce, Juliano, Caio (agregado rsrsrs). Vocês, nas mínimas atitudes, fizeram meus dias mais felizes!!

À minha todynho, companheira de aventura, Gracilda, que desde o mestrado vem me acompanhando nas mais interessantes aventuras. Que tu tenhas sucesso na carreira profissional e na tua vida pessoal também. Obrigada por tudo!

Às meninas, Gabi e Laura, que me ajudaram nos últimos experimentos após o doutorado sanduíche. Sem elas, teria perdido o juízo (mais do que perdi) na fase final do doutorado. Eu desejo muito sucesso no mestrado de vocês e estarei sempre à disposição no que precisarem.

À Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) por saber incentivar o ensino, pesquisa e extensão, não apenas no âmbito estadual, mas também a nível internacional.

À secretaria de pós-graduação, que atendeu prontamente aos questionamentos relacionados às burocracias do programa BBAF.

Ao programa BBAF, pela oportunidade de participar do corpo discente e assegurando bolsa e auxílios necessários para encaminhamento do doutorado.

Ao Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia: diretoria, docentes, técnicos, servidores, terceirizados e discentes.

Aos colaboradores que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular da FCFAR, por nos acolherem nos dois primeiros anos do doutorado enquanto o prédio do DBB estava em fase de construção. E também por toda ajuda prestada em relação aos equipamentos e materiais de laboratório.

Aos colaboradores da Hochschule Mannheim (Alemanha) em especial ao Professor Matthias Mack que nos recebeu com sorriso aberto e um coração enorme em seu laboratório. Também agradeço à: Frau Koch, Kerstin, Chrissi, Mischl, Sonja, Carmem, Ben, Rodrigo, Ahmed, Lena, Thomas, Gaby, Carolin, Felix. Obrigada pelos cafés, pelos almoços e pelas conversas. Danke für alles!!

À minha primeira casa, Universidade Federal de Pernambuco, e às pessoas com as quais tive oportunidade de estudar, trabalhar e pesquisar. Aqui foi o lugar onde dei meus passos iniciais na pesquisa, onde me graduei e fiz mestrado, e onde cresci profissionalmente. Lembro que lá sempre fui ensinada a dar passos maiores e a enfrentar os obstáculos que surgissem. Levo isso comigo sempre!

A todos que fazem parte do Carls Duisberg Center e aos amigos que fiz durante o curso de alemão em Munique. Foram dois meses de aprendizado multicultural os quais nunca irei esquecer! Cada momento valeu a pena! Gracias, ありがとう, Danke, Grazie, 감사합니다, Merci, 谢谢 !

Ao grupo de brasileiros (mais o colombiano e mais o gaúcho – piada interna) 'arretado de bom". Os FFs foram maravilhosos e espero que um dia consigamos fazer no Brasil!!

A todos os bolsistas desse BRASIL, pois vocês, nós, somos verdadeiros guerreiros em fazer pesquisa num país que não dá o suporte necessário. Parece que dias piores estão por vir, mas que continuemos na luta tentando mudar esse país!!

À CAPES, por me proporcionar a bolsa do doutorado no país, além do auxílio dado à pós-graduação (código de financiamento 001).

Ao CNPq, por fomentar a bolsa do doutorado sanduíche na Alemanha (Hochschule Mannheim) e do curso de alemão no Carls Duisberg Center em Munique (processo 290110/2017-3).

À FAPESP, por incentivar a pesquisa em nosso laboratório com os auxílios do projeto jovem pesquisador da minha orientadora.

"Science, for me, gives a partial explanation for life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment."

Rosalind Franklin

RESUMO

As técnicas mais usadas atualmente para alterar o fluxo metabólico por uma determinada via são a deleção e/ou inserção de sequências regulatórias ou genes no cromossomo bacteriano. Estes são métodos que alteram permanentemente a via metabólica em questão, perturbando o balanço metabólico durante a fase lag de crescimento, o que muitas vezes leva a um excessivo prolongamento desta fase além de diminuir a viabilidade celular. O metabolismo de purinas em *Bacillus subtilis* tem grande potencial para manipulação genética e produz metabólitos com valor biotecnológico. Cinco *riboswitches* (*purE*, *xpt*, *nupG*, *pbuE* e *pbuG*) controlam o metabolismo de purina em *B. subtilis* promovendo a terminação precoce da transcrição em ligação com guanina ou adenina. O GTP gerado nesta via é utilizado na biossíntese da vitamina B_2 (riboflavina), apresentando o mesmo mecanismo de regulação com *riboswitch* de flavina-monofosfato (*ribDG*). Neste estudo, um novo modelo de controle de metabolismo de purina foi construído visando o aumento reversível do fluxo de carbono pela via em *B. subtilis* utilizando pequenos RNAs não-codificadores sintéticos (sRNAs). Estes foram desenhados e sintetizados para interferir na regulação da expressão gênica realizada pelos *riboswitches*, mantendo assim a via biossintética ativa. Os *riboswitches* foram caracterizados por uma nova metodologia *in vitro* na presença dos ligantes guanina, adenina ou FMN, e nas células de *B. subtilis*, sendo possível constatar o papel regulador sobre o operon da bioluminescência *luxABCDE*. Os sRNAs sintéticos foram desenhados no software Ribomaker para interferir na estrutura secundária dos *riboswitches* e, após simulações *in silico* da interação intermolecular *riboswitch*-sRNA, a funcionalidade dos sRNAs também foi ensaiada *in vitro*. *B. subtilis* reprogramado com os sRNAs desenhados contra os *riboswitches purE*, *pbuE* e *ridDG* foram capazes de neutralizar o efeito riborregulador comparado aos controles, após análises de bioluminescência e fluorescência em leitor de microplacas. A inserção da sequência RiboJ à extremidade 5' UTR do sRNA(*purE*) proporcionou ótimas características a *B. subtilis* para ser utilizada como uma linhagem industrial, por exemplo, fase lag diminuída e crescimento populacional maior. Foi possível modelar exemplarmente o bem estudado metabolismo de purinas nesta bactéria amplamente utilizada pela indústria biotecnológica, e demonstrar que a tecnologia sRNA é realmente adequada para a engenharia metabólica de cepas microbianas produtoras de produtos biotecnológicos. A vantagem deste conceito inovador de controle é que a expressão do gene pode ser tanto ligada como desligada conforme necessário. O novo conceito é amplamente aplicável e pode ser um elemento inovador no portfólio da moderna biologia sintética.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. Purinas. Riboflavina. Riborregulação. *Riboswitch*. RNAs reguladores. RNAs sintéticos.

ABSTRACT

The currently employed tools to redirect metabolic flux through a specific pathway are deletion and/or insertion of regulatory sequences or genes in the bacterial chromosome. These methods permanently modify the pathway perturbing the metabolic balance during the lag growth phase, which generally extends this process and also decreases cell viability. The purine metabolism in *Bacillus subtilis* has great potential for genetic manipulation and produces value-added biotechnological products. Five riboswitches (*purE, xpt*, *nupG, pbuE* and *pbuG*) control the purine metabolism in *B. subtilis* by promoting the premature transcription termination guided by guanine or adenine levels in the cell. The GTP generated in this pathway is used in the biosynthesis of vitamin B_2 (riboflavin), which is regulated by a flavin-monophosphate riboswitch (*ribDG*). In this study, a new metabolism control model was developed aiming to reversibly increase the carbon flux through selected pathways employing small synthetic non-coding RNAs (sRNAs). These sRNAs were designed and synthesized to interfere with the regulation of gene expression performed by the riboswitches, thus maintaining the biosynthetic pathways active. The riboswitches were characterized by a new *in vitro* methodology in the presence of the ligands: guanine, adenine or FMN. The riboswitches were characterized *in B. subtilis* cells using the *luxABCDE* bioluminescence operon as reporter. Synthetic sRNAs were designed in the Ribomaker software to interfere with the secondary structure of the riboswitches and, following *in silico* simulations of the intermolecular riboswitch-sRNA interaction, sRNA functionality was also assayed *in vitro*. *B. subtilis* reprogrammed with the sRNAs designed against the *purE*, *pbuE* and *ridDG* riboswitches were able to neutralize the riboregulatory effect comparing to the controls. Insertion of the RiboJ sequence to the 5' UTR site of the sRNA(*purE*) provided excellent features to *B. subtilis* as an industrial strain, as shorter growth lag phase and increased population density. It was possible to exemplarily model the well-studied purine metabolism in this bacteria which is widely used by the biotechnology industry and to demonstrate that sRNA technology is actually suitable for the metabolic engineering of producing strains. The advantage of this novel control concept is that gene expression can be either turned ON or OFF as needed. The new concept is widely applicable and may be an innovative element in the portfolio of modern synthetic biology.

Keywords: *Bacillus subtilis*. Purines. Regulatory RNAs. Riboflavin. Riboregulation. Riboswitch. Synthetic RNAs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Biossíntese de purina em bactérias. As etapas enzimáticas de 1 a 14 são responsáveis pela conversão de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a GTP. [I] 5-fosfo-D-ribosil-amina; [II] 5-fosfo-ribosil-glicineamida; [III] 5-fosforibosil-N-formilglicineamida; [IV] 5-fosforibosil-N-formilglicineamidina; [V] 5-amino-1-(5-fosfo-D-ribosil)imidazol; [VI] 5-amino-1-(5-fosfo-D-ribosil)imidazol-4-carboxilato; [VII] 5-fosforibosil-4-(N-succinocarboxamida)-5-aminoimidazol; [VIII] 5-phosphoribosil-5-amino-4-imidazol carboxamida; [IX], 5-fosforibosil-5-formamida-4-imidazol carboxamida; IMP; XMP; GMP; GDP; GTP 24

Figura 2- Representação do metabolismo de purinas em *B. subtilis*: síntese *de novo* e importação de purinas do meio extracelular. Setas com linhas sólidas são conversões metabólicas e setas com linhas tracejadas representam transporte através da membrana. Quadros em roxo e laranja: genes e operons que fazem parte do metabolismo e são regulados por *riboswitches* 25

Figura 3- Representação geral da produção de riboflavina em bactérias a partir de GTP e ribulose-5-fosfato (genes representados em quadros na cor roxa) e o operon relacionado ao metabolismo de riboflavina em *B. subtilis*, cuja expressão é regulada pelo *riboswitch ribDG* 27

Figura 4- Representação da estrutura dos *riboswitches* de purinas na região 5' UTR de um mRNA: aptâmero [região receptora de guanina (G) ou adenina (A)] e plataforma de expressão (formação de *hairpin* terminador ou antiterminador). **A:** *Riboswitch* de guanina: quando há G em altas concentrações, este se liga ao aptâmero e impede a transcrição do gene *downstream* (OFF). **B:** *Riboswitch* de adenina: quando A está ligada, há a formação do antiterminador permitindo a transcrição (ON) pela RNA polimerase 31

Figura 5- Representação dos plasmídeos replicativos pPrib.luc com os *riboswitches* de guanina (*purE*, *xpt* e *nupG*), adenina (*pbuE*) e FMN (*ribDG*) em fusão transcricional com o gene da luciferase de vagalume *luc* 35

Figura 6- Esquema para avaliação da expressão gênica *in vitro* desenvoldida em nosso estudo para avaliar a funcionalidade dos *riboswitches* de purinas e FMN 38

Figura 7- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem dos *riboswitches* de purina e FMN contendo os sítios de restrição padrão *Biobrick* (E: *Eco*RI, X: *Xba*I, S: *Spe*I e P: *Pst*I), o cassete do gene *rfp* e de resistência para cloranfenicol *cat*, operon *luxABCDE* como repórter e integra em *Bacillus subtilis* no locus *sacA* 39

Figura 8- Representação do sistema idealizado neste trabalho para caracterização *in vivo* dos *riboswitches* que regulam genes do metabolismo em *Bacillus subtilis*. O plasmídeo pBS3Clux contendo o promotor P*srfA* ou P*veg* que controla a transcrição dos *riboswitches* de guanina (*purE*, *xpt* e *nupG*), adenina (*pbuE*) e FMN (*ribDG*) e operon *luxABCDE* responsável pela bioluminescência. BBp: Biobrick prefixo; BBs: Biobrick sufixo 39

Figura 9- Desenho gerado no software Ribomaker de um sRNA com função regulatória tendo como alvo a sequência consenso representativa dos aptâmeros dos *riboswitches* de purina presentes em *B. subtilis*. A letra N na sequência consenso indica uma posição altamente variável nas cinco sequências analisadas. O programa automaticamente insere ribonucleotídeos nas posições marcadas por N e, com base nessa sequência, gera um sRNA de tamanho pré-definido (80 nt, no exemplo abaixo). O sRNA é composto por uma sequência complementar ou parcialmente complementar à sequência consenso (letras maiúsculas) e por uma outra sequência, localizada na extremidade 3'-, que constitui um terminador da transcrição (letras minúsculas). As

estruturas secundárias formadas pelo sRNA estão representadas na figura: nucleotídeos marcados com "." encontram-se não pareados e os representados por "(" e ")" encontram-se pareados 42
Figura 10- Representação das partes do *riboswitch* de purina (aptâmero e plataforma de expressão) e a localização da *seed site*, a qual foi usada como modelo para desenho dos sRNAs sintéticos no software Ribomaker 42
Figura 11- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem dos sRNAs sintéticos contendo os sítios de restrição padrão *Biobrick* (E: *Eco*RI, X: *Xba*I, S: *Spe*I e P: *Pst*I), o cassete do gene *rfp* e de resistência para eritromicina *erm* e integra em *Bacillus subtilis* no locus *lacA* 44
Figura 12- Representação da segunda unidade de transcrição contendo o sRNA específico projetado para os *riboswitches* de purinas e FMN sendo regulado pelo promotor *grac*, integrado ao locus *lacA* em *Bacillus subtilis* que contém o sistema *riboswitch*-operon *lux* nos genomas 44
Figura 13- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem do sistema sRNA-RNA-Broccoli contendo os sítios de restrição padrão *Biobrick* (E: *Eco*RI, X: *Xba*I, S: *Spe*I e P: *Pst*I), o cassete do gene *rfp* e de resistência para cloranfenicol *cat* e integra em *Bacillus subtilis* no locus *amyE* 46
Figura 14- Caracterização *in vitro* da funcionalidade do *riboswitch purE* na presença de guanina e adenina variando as contrações em 50, 100 e 250 µM. O maior nível de atividade luciferase do controle (sem adição de purina) foi determinado como 100% e comparado aos tratamentos aplicados. Análise de variância com valor p<0,05; médias que não possuem a mesma letra (a, b e c) são significativamente diferentes 58
Figura 15- Caracterização *in vitro* da funcionalidade dos *riboswitches*. **A-D:** *riboswitches* de purina; **E:** *riboswitch* de FMN *ribDG*. Aos controles, foi adicionada a mesma solução tampão usada para preparar a solução estoque das substâncias testadas. Guanina, adenina e flavina 5'-monofosfato (FMN) foram adicionadas a reação em concentração de 50µM para as purinas e 100 µM para FMN. Os maiores níveis de atividade luciferase obtidos foram determinados como 100% e comparados aos tratamentos aplicados. Análise de variância com valor p<0,05; médias que não possuem a mesma letra (a, b e c) são significativamente diferentes 60
Figura 16- Bioluminescência (x100 unidade arbitrária) versus tempo de crescimento (minutos) de *Bacillus subtilis* integrado com *Promotor-luxABCDE* em microcultivo realizado no equipamento Infinite M200 Tecan, com meio LB (Controle; G: guanina 50 µM; A: adenina 50 µM) 62
Figura 17- Bioluminescência (x100 unidade arbitrária) versus tempo de crescimento (minutos) de *B. subtilis* integrado com *purE/luxABCDE* (**A**), *xpt*/*luxABCDE* (**B**), *nupG/luxABCDE* (**C**) e *pbuE*/*luxABCDE* **(D)**. Microcultivos realizados no equipamento Infinite M200 Tecan utilizando o meio LB (Controle somente com LB; G: guanina 50 µM; A: adenina 50 µM) 63
Figura 18- Simulação realizada no software Nupack representando a provável estrutura secundária do *riboswitch purE*. Cada nucleotídeo é representado por um círculo colorido, cuja cor configura a probabilidade de equilíbrio entre as bases nitrogenadas (variando entre 0,0 – 1,0). A energia livre foi calculada em -18,60 kcal/mol 65
Figura 19- Estrutura secundária do complexo *riboswitch purE*-sRNA gerada pelo software NUPACK. Nucleotídeos representados por círculos coloridos, os quais as cores representam a probabilidade de equilíbrio durante a hibridização das partes na simulação *in silico*. A energia livre calculada foi -65,78 kcal/mol …….. 66
Figura 20- Atividade da luciferase (%) produzida após reação de transcrição e

tradução *in vitro* dos *riboswitches* de guanina (A-C), adenina (D) e flavina 5'-monofosfato FMN (E), na presença de guanina ou adenina ou FMN e com o sRNA específico [sRNA(es)] e sRNA não-específico [sRNA(Nes)]. Análise de variância com valor p<0,05; médias que não possuem a mesma letra (a, b e c) são significativamente diferentes 68
Figura 21- Bioluminescência (x100 unidade arbitrária) versus tempo de crescimento (minutos) de *B. subtilis*::*purE*/*luxABCDE*::sRNA(*purE*) em microcultivo realizado no equipamento Infinite M200 Tecan, com meio LB, após indução por IPTG (Controle; G: guanina 50 µM) 69
Figura 22- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em minutos) de *B. subtilis* 168 selvagem, *B. subtilis*::*purE*/*luxABCDE*::2E sem o sRNA (controle), *B. subtilis* reprogramado com o sRNA específico *B. subtilis*::*purE*/*luxABCDE*::sRNA(*purE*) e *B. subtilis* reprogramado com o sRNA(*xpt*) inespecífico para o *riboswitch*. **B:** Taxa de ativação da expressão gênica causada pelos sRNAs *purE* e *xpt*, calculada através da razão entre os valores de bioluminescência normalizados de *B. subtilis* expressando um dos sRNAs por *B. subtilis* controle sem sRNA. Linha em vermelho corresponde a taxa de ativação igual a 1,0, sendo níveis de bioluminescência igual ao controle sem sRNA. 71
Figura 23- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em minutos) de *B. subtilis* 168 selvagem, *B. subtilis*::*pbuE*/*luxABCDE*::2E sem o sRNA (controle) e *B. subtilis* reprogramado com o sRNA específico *B. subtilis*::*pbuE*/*luxABCDE*::sRNA(*pbuE*). **B:** Taxa de ativação da expressão gênica causada pelo sRNA(*pbuE*), calculada pela razão entre os valores de bioluminescência normalizados de *B. subtilis* expressando o sRNA(*pbuE*) por *B. subtilis* controle sem sRNA 73
Figura 24- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em minutos) de *B. subtilis* 168 selvagem, *B. subtilis*::*xpt*/*luxABCDE*::2E sem o sRNA (controle) e *B. subtilis* reprogramado com o sRNA específico *B. subtilis*::*xpt*/*luxABCDE*::sRNA(*xpt*). **B:** Taxa de ativação da expressão gênica causada pelo sRNA(*xpt*), calculada pela razão entre os valores de bioluminescência normalizados de *B. subtilis* expressando o sRNA(*xpt*) por *B. subtilis* controle sem sRNA. Linha em vermelho corresponde a taxa de ativação igual a 1,0, sendo níveis de bioluminescência igual ao controle sem sRNA . 74
Figura 25- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em minutos) de *B. subtilis* 168 selvagem, *B. subtilis*::*nupG*/*luxABCDE*::2E sem o sRNA (controle) e *B. subtilis* reprogramado com o sRNA específico *B. subtilis*::*nupG*/*luxABCDE*::sRNA(*nupG*). **B:** Taxa de ativação da expressão gênica causada pelo sRNA(*nupG*), calculada pela razão entre os valores de bioluminescência normalizados de *B. subtilis* expressando o sRNA(*nupG*) por *B. subtilis* controle sem sRNA. Linha em vermelho corresponde a taxa de ativação igual a 1,0, sendo níveis de bioluminescência igual ao controle sem sRNA 75
Figura 26- Curva padrão para quantificação de riboflavina (µM) com concentrações variando entre 0,024 a 6,25 µM, sendo definida a equação da reta e o R^2 após análise da fluorescência (u.a.) com condições de emissão 525 nm e excitação a 450nm 76
Figura 27- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em minutos) de *B. subtilis::*2E controle sem o sRNA, *B. subtilis*::sRNA(*purE*) e *B. subtilis* reprogramado com o sRNA(*ribDG*), todos sem o operon *luxABCDE*. **B:** Taxa de ativação da expressão gênica causada pelo sRNA(*ribDG*), calculada pela razão entre os valores de fluorescência normalizados de *B. subtilis* expressando um dos sRNAs por *B. subtilis* controle sem sRNA. **C:** Concentração de riboflavina (nM) obtida após cálculo da fluorescência submetida à equação da curva padrão da linhagem reprograma com o

sRNA(*ribDG*) 77
Figura 28- Curva de crescimento (DO600) versus leitura de fluorescência (unidade arbitrária) do *B. subtilis*::sRNA(*purE*)-RNA-Broccoli. Após 130 minutos de cultivo, foi adicionado IPTG e o fluoróforo DFHBI 78
Figura 29- Fluorescência, em unidade arbitrária, produzida por *B. subtilis*::sRNA(*purE*)-RNA-Broccoli durante 24 horas de crescimento em meio definido. Após indução por IPTG, o fluoróforo DFHBI foi adicionado a cada leitura 79
Figura 30- Estrutura secundária do complexo *riboswitch purE*-RiboJ/sRNA gerada pelo software NUPACK. Os nucleotídeos estão representados por círculos coloridos, os quais as cores representam a probabilidade de equilíbrio durante a hibridização das partes na simulação *in silico* variando de 0,0–1,0, sendo 1,0 a maior probabilidade. A energia livre calculada foi -89,28 kcal/mol 80
Figura 31- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em minutos) de *B. subtilis* 168 selvagem, *B. subtilis*::*purE*/*luxABCDE*::2E sem o sRNA(controle), *B. subtilis* reprogramado com o sRNA(*purE*) e *B. subtilis* reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA(*purE*). **B:** Taxa de ativação da expressão gênica causada pelo sRNA *purE* e RiboJ-sRNA(*purE*), calculada pela razão entre os valores de bioluminescência normalizados de *B. subtilis* expressando o sRNA(*purE*) e RiboJ-sRNA(*purE*) por *B. subtilis* controle sem sRNA 82
Figura 32- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em horas) de *B. subtilis* 168 selvagem, *B. subtilis*::*purE*/*luxABCDE*::sRNA(*purE*), *B. subtilis* reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA(*purE*) e *B. subtilis*::*xpt/luxABCDE*::RiboJ-sRNA(*purE*) como controle. **B:** Taxa de ativação da expressão gênica calculada pela razão entre os valores de bioluminescência normalizados de *B. subtilis* reprogramados pelo controle sem sRNA. Linha em azul corresponde a taxa de ativação igual a 1,0, sendo níveis de bioluminescência igual ao controle sem sRNA 84
Figura 33- A: Cromatograma da solução contendo a guanina em concentração de 3,7 mM, com o tempo de retenção 6,840 minutos; **B:** Cromatograma da solução contendo adenina em concentração de 3,3 mM, com o tempo de retenção 13,598 minutos. **C:** Cromatograma da solução contendo a guanina (G) e adenina (A) em concentração de 0,92 e 0,82 µM e com tempo de retenção de 6,716 minutos e 14,067 minutos, respectivamente. Logo após 2 minutos de corrida, o volume morto (ácido perclórico 2M) é captado pelo detector DAD. As condições padronizadas no HPLC foram: solução A – tampão fosfato 0,3 M e solução B – tampão fosfato 0,3 M + acetonitrila (80%/20%, v/v), com fluxo de 1,0 mL/min 85
Figura 34- Curvas padrão para quantificação de guanina e adenina (mM) com concentrações variando entre 0,025 a 3,7 mM, sendo definida a equação da reta e o R^2 após análise da área de cada ponto a 254 nm no detector DAD em HPLC 86
Figura 35- Curva de crescimento de *B. subtilis*::2E (controle sem sRNA), *B. subtilis* reprogramado com o sRNA(*purE*) e *B. subtilis* reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA(*purE*). Em destaque com asterisco são os pontos de coleta das amostras para quantificação das purinas por HPLC 87
Figura 36- Aumento em percentual da produção de guanina **(A)** e adenina **(B)** versus tempo de crescimento em horas das linhagens reprogramadas *B. subtilis*::sRNA(*purE*) e *B. subtilis*::RiboJ-sRNA(*purE*) em comparação com o controle sem o sistema de sRNA sintético 88
Figura 37- Operon idealizado contendo todos os sRNAs e RiboJs em *tandem* visando a construção da linhagem de *Bacillus subtilis* industrial com pool intracelular de purinas 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência da RNA-Broccoli a qual foi fusionada com os sRNAs desenhados para interferir na regulação dos *riboswitches* de purinas 46

Tabela 2- Lista de oligos sintetizados e utilizados neste estudo com a descrição das sequências, temperatura de anelamento (TM) e a finalidade do uso 50

Tabela 3- Lista de plasmídeos gerados neste estudo com a descrição das características e cassete de resistência. AMP: ampicilina (100 µg/mL) ……..…… 52

Tabela 4- Lista de linhagens de *B. subtilis* geradas neste estudo com a descrição das características e cassete de resistência. CN: cloranfenicol (5 µg/mL); ERI: eritromicina (1 µg/mL) ……... 55

Tabela 5- Sequências 5'-3' dos sRNAs geradas no software Ribomaker com o objetivo de hibridizar com os *riboswitches* de guanina, adenina e FMN em *Bacillus subtilis* 64

Tabela 6- Sequência da RiboJ a qual foi fusionada com o sRNA desenhado para interferir na regulação do *riboswitch* de guanina *purE* 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5´ UTR	Região 5’ não-traduzida
2E	Plasmídeo pBS2E quando integrado ao cromossomo de *B. subtilis*
AMP	Adenosina 5´-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BBp	*Biobrick* prefixo
BBs	*Biobrick* sufixo
BSA	Albumina de soro bovino
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CIP	Enzima fosfatase alcalina
DAD	Detector de arranjo de diodos
DFHBI	3,5-difluoro-4-hidroxibenzilideno imidazolinona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina 5’-monofosfato
GDP	Guanosina 5’-difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
GMP	Guanosina 5’-monofosfato
GRAS	*Generally reconized as safe*
GTP	Guanosina trifosfato
$HClO_4$	Ácido perclórico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMP	Inosina 5’-monofosfato
IPTG	Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
$K_2HPO_4x_3H_2O$	Fosfato de potássio dibásico trihidratado
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
$MgSO_{4x3}H_2O$	Sulfato de magnésio trihidratado
$MnSO_{4X}H_2O$	Sulfato de manganês monohidratado
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
ncRNAs	RNAs não codificadores
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônio
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
RFP	*Red Flourescent Protein*
RNA	Ácido ribonucleico
SOC	Meio de cultura líquido *Super optimal* suplementado com glicose
sRNA	Pequeno RNA
sRNA(es)	sRNAs específicos
sRNA(Nes)	sRNAs não-específicos
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris-HCl	Tampão Tris-ácido clorídrico
XMP	Xantosina 5’-monofosfato
$ZnCl_2$	Cloreto de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	Quilodalton
µM	Micromolar
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
µL	Microlitro
ng/µL	Nanogramas por microlitro
%	Percentual
x	Vezes
ng	Nanogramas
U/µL	Unidades por microlitro
seg	segundos
U/mL	Unidades por mililitro
mL	Mililitro
xg	Vezes maior que a força da gravidade
M	Molar
min	Minutos
g/L	Gramas por litro
µg/mL	Microgramas por mililitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
min/kb	Minuto por quilobase
U/µg	Unidade por micrograma
nm	Nanômetro
ms	Milissegundo
::	Integração ao cromossomo
µm	Micrômetro
mL/min	Mililitro por minuto
ΔG°	Energia livre de Gibbs
kcal/mol	Quilocaloria por mol
R^2	Coeficiente de determinação
u.a.	Unidade arbitrária
kb	Quilobase

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 18
1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 Por que usar a bactéria *Bacillus subtilis* como chassis de produção? 21
2.2 Biologia sintética e uso de ferramentas computacionais 22
2.3 Metabolismo de purinas e regulação da expressão gênica em *Bacillus subtilis* . 22
2.4 Produção da Riboflavina (vitamina B_2) a partir do metabolismo de purinas 26
2.5 RNAs não-codificadores (ncRNAs) 28
2.5.1 *Riboswitches* 29
3 OBJETIVO 33
3.1 Objetivos específicos 33
4 MATERIAIS E MÉTODOS 34
4.1 Caracterização dos *riboswitches* de purinas e FMN 34
4.1.1 Desenvolvimento de método para expressão gênica *in vitro* 34
4.1.2 Clonagem dos *riboswitches* em plasmídeos replicativos 35
4.1.3 Expressão gênica *in vitro* dos *riboswitches* 36
4.1.4 Integração dos *riboswitches* no cromossomo de *Bacillus subtilis* 38
4.1.5 Funcionalidade e caracterização *in vivo* das linhagens de *B. subtilis* 40
4.2 Caracterização dos pequenos RNAs sintéticos 41
4.2.1 Design e avaliação *in silico* dos sRNAs 41
4.2.2 Expressão gênica *in vitro* dos sistemas *riboswitch*-sRNA 43
4.2.3 Integração dos sRNAs no cromossomo de *B. subtilis* 44
4.2.4 Funcionalidade do sistema em *B. subtilis* reprogramado com os sRNAs 45
4.3 Confirmação de um modelo de reprogramação do metabolismo de purinas 46
4.3.1 Avaliação da transcrição e estabilidade dos sRNAs na célula 46
4.3.2 Sequência estabilizadora RiboJ fusionada ao sRNA 47
4.3.3 *Scale-up* de *B. subtilis* reprogramados com sRNA e RiboJ-sRNA 48
4.3.4 Quantificação de guanina e adenina produzidas pelas linhagens de *B. subtilis* reprogramas 48
5 RESULTADOS 50
5.1 Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados para desenvolvimento do trabalho 50
5.2 Plasmídeos e linhagens geradas neste estudo 52
5.3 Desenvolvimento de metodologia para expressão gênica *in vitro* de *riboswitches* 58
5.4. Caracterização da funcionalidade dos *riboswitches* 59
5.4.1 Expressão gênica *in vitro* 59
5.4.2 Funcionalidade *in vivo* dos *riboswitches* em *Bacillus subtilis* 61
5.5 Pequenos RNAs sintéticos como ferramenta de riborregulação 64
5.5.1 Design e avaliação *in silico* dos sRNAs 64
5.5.2 Funcionalidade dos sRNAs *in vitro* 67
5.5.3 Ensaio preliminar *in vivo* com sRNA(*purE*) 69
5.5.4 Ensaios *in vivo* dos sRNAs em *B. subtilis* 69
5.5.5 Ensaios *in vivo* so sRNA desenhado para o *riboswitch ribDG* 75
5.6 Modelo funcional de sRNA(*purE*) para reprogramação do metabolismo de purinas em *Bacillus subtilis* 78
5.6.1 Estabilidade do sRNA(*purE*) transcrito na célula 78
5.6.2 RiboJ como sequência não-traduzida e estabilizadora do sRNA(*purE*) 79

5.6.3 *Scale-up* de *B. subtilis* reprogramado com RiboJ-sRNA(*purE*) 82
5.6.4 Quantificação de guanina e adenina produzidas pelas linhagens de *B. subtilis* reprogramas com sRNA(*purE*) e RiboJ-sRNA(*purE*) por Cromatografia Líquida de Alta Perfomance HPLC 84
5.6.4.1 Calibração do método para quantificação de purinas 84
6 DISCUSSÃO 90
7 CONCLUSÕES 95
8 PERSPECTIVAS DO TRABALHO 96
REFERÊNCIAS 97
APÊNDICES 103
CAPÍTULO II (Artigos publicados em periódicos) 108

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A biologia sintética é uma área emergente com grande potencial na manipulação de sistema vivos, combinando o conhecimento e técnicas da química, biologia, ciência da computação e engenharia. Um dos objetivos é a elaboração de dispositivos biológicos sintéticos com diversas aplicações: tratamento de doenças, biorremediação, biossíntese de compostos químicos e otimização da biossíntese de metabólitos secundários, dentre outras (CHEN; GALLOWAY; SMOLKE, 2012).

Os novos conceitos desenvolvidos pela biologia sintética mostram que a pesquisa por novos produtos, novas vias de produção e novas funções não precisa se restringir ao lento processo de seleção de organismos com propriedades interessantes. Cada vez mais se torna real a ideia da construção de células como biofábricas, bioprocessadores e biossensores capazes de desempenhar funções complexas para as quais foram programadas (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014).

Várias tecnologias utilizando a biologia sintética têm sido desenvolvidas para atender às demandas de indústrias. Por exemplo, mecanismos reguladores realizados por RNAs foram descritos mostrando sua importância no controle de vias metabólicas em microrganismos, sendo o modo de regulação geralmente dependente da relação entre as estruturas secundárias destes RNAs e o gene regulado de uma via específica (IRNOV et al., 2010).

A vantagem da reprogramação de vias metabólicas pelo uso de pequenos RNAs (sRNAs) sobre as técnicas comumente empregadas, como deleções e seleção de mutantes resistentes a antimetabólitos, é a possibilidade de manipular uma via metabólica essencial para o organismo sem reduzir sua velocidade de crescimento ou levá-lo à morte, otimizando as condições de cultivo e aumentando a produção de metabólitos, sendo características interessantes para processos fermentativos.

O metabolismo alvo deste trabalho é a biossíntese de purinas em *Bacillus subtilis*, que gera moléculas de alto valor biotecnológico (hipoxantina, guanosina), além de precursores que interagem com outras vias como metabolismo de aminoácidos, das pentoses, glicólise, biossíntese de vitaminas (como exemplo, riboflavina) e a biossíntese de nucleotídeos.

Alguns dos genes e operons que atuam no metabolismo de purinas em *B. subtilis* são regulados por cinco *riboswitches*. *Riboswitches* são sequências de RNA geralmente localizadas na extremidade 5’ da região não codificadora de um mRNA (5’ UTR), capazes de regular a expressão gênica através de mudança estrutural se ligado ou não a um determinado

metabólito. Os genes controlados por *riboswitches* estão geralmente envolvidos na biossíntese e transporte dos seus ligantes cognatos (GARST; EDWARDS; BATEY, 2011).

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de pequenos RNAs não codificadores (sRNAs) sintéticos, com a finalidade de interferir na atuação dos *riboswitches* responsáveis pela regulação do metabolismo das purinas e biossíntese de riboflavina. Os alvos escolhidos são os *riboswitches* que controlam a expressão dos genes envolvidos tanto na biossíntese de purinas e transporte destas através da membrana, quanto o *riboswitch* que regula os genes da biossíntese da riboflavina.

Desta forma, planejou-se preservar a biossíntese em pleno funcionamento, mantendo a importação dos intermediários da via e desativando a exportação, criando assim uma linhagem de *Bacillus subtilis* com elevado *pool* intracelular de purinas que possa ser direcionado para a produção de vitamina B_2 (riboflavina).

7 CONCLUSÕES

Uma metodologia eficiente foi desenvolvida para a determinação *in vitro* da expressão gênica do gene *luc* e atividade reguladora dos *riboswitches* envolvidos no metabolismo de purinas, em *Bacillus subtilis*. Este método pode ser aplicado para caracterização de outros sistemas contendo riborreguladores.

O design de pequenos RNAs sintéticos utilizando ferramentas *in silico*, assim como a caracterização reguladora *in vitro*, foram possíveis, e se observou que houve interferência dos sRNAs no controle causado pelos *riboswitches* do gene *luc*. O design racional de sRNAs reguladores é uma possibilidade real visando a neutralização do efeito regulador de *riboswitches* ou outros sistemas de riborregulação.

Os sRNAs *purE* e *pbuE* foram inseridos no cromossomo de linhagens de *B. subtilis*, e estas funcionam com o metabolismo de purinas reprogramado pelo aumento da concentração de guanina e adenina intracelular. Assim como, *B. subtilis* reprogramdo com o sRNA(*ribDG*) foi capaz de aumentar a produção de riboflavina. Portanto, a funcionalidade dos sRNAs foi comprovada e estes conseguem reprogramar de maneira específica o metabolismo de purinas ou da riboflavina.

A sequência estabilizadora RiboJ mostrou ser eficaz ao ser fusionada com o sRNA(*purE*), causando o impedimento da riborregulação. Foi possível confirmar que *Bacillus subtilis* reprogramados com pequenos RNA sintéticos, isoladamente e quando fusionados à sequência insuladora, são capazes de manter *pool* intracelular de guanina, o que foi proposto como objetivo.

O modelo de controle do fluxo metabólico proposto neste trabalho poderá ser futuramente útil no desenvolvimento de linhagens na produção de outras substâncias de interesse biotecnológico, derivadas do metabolismo primário de *B. subtilis*, como a riboflavina.

REFERÊNCIAS

ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, p. 321-360, 2011.

AGHDAMA, E. M.; HEJAZI, M. S.; BARZEGAR, A. Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. **Gene**, v. 592, p. 244-259, 2016.

BATEY, R. T. Structure and mechanism of purine binding riboswitches. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 45, n. 3, p. 345-381, 2012. DOI: 10.1017/S0033583512000078.

BERA, A. K.; ZHU, J.; ZALKIN, H.; SMITH, J. L. Functional dissection of the *Bacillus subtilis* pur operator site. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 14, p. 4099-4109, 2003.

BREAKER, R. R. Riboswitches and the RNA World. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2010.

BRON, S.; MEIMA, R.; VAN DIJL, J. M.; WIPAT, A.; HARWOOD, C. R. Molecular biology and genetics of *Bacillus* species. DEMAIN, A. L. et al. (Editors). **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2nd. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press, 1999. Chapter 33, p. 392-416. ISBN: 978-1-55581-128-0.

CAI, D.; RAO, Y.; ZHAN, Y.; WANG, Q.; CHEN, S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 6, p. 1632-1642, 2019.

CAMERON, D. E.; BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. A brief history of synthetic biology. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, p. 381-390, 2014.

CASCANTE-ESTEPA, N.; GUNKA, K.; STÜLKE, J. Localization of components of the RNA-degrading machine in *Bacillus subtilis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1492, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01492.

CHEN, Y. Y.; GALLOWAY, K. E.; SMOLKE, C. D. Synthetic biology: advancing biological frontiers by building synthetic systems. **Genome Biology**, v. 13, n. 2, p. 240, 2012. DOI: 10.1186/gb-2012-13-2-240.

CHEN, G.; YANOFSKY, C. Tandem transcription and translation regulatory sensing of uncharged tryptophan tRNA. **Science**, v. 301, n. 5630, p. 211-213, 2003. DOI: 10.1126/science.1084902.

CONDON, C. RNA Processing and degradation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 2, p. 157-174, 2003. DOI: 10.1128/MMBR.67.2.157–174.2003.

DUBNAU, D. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 395-424, 1991.

EBBOLE, D.J.; ZALKIN, H. Cloning and characterization of a 12-gene cluster from *Bacillus subtilis* encoding nine enzymes for *de novo* purine nucleotide synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 17, p. 8274-8287, 1987.

FILONOV, G. S.; MOON, J. D.; SVENSEN, N.; JAFFREY, S. R. Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 16299-16308, 2014.

GARCÍA-ANGULO, V. A. Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 196-209, 2017. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1192578.

GARST, A. D.; EDWARDS, A. L.; BATEY, R. T. Riboswitches: Structures and Mechanisms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 6, 2011. DOI: 10.1101/cshperspect.a003533.

GONG, S.; WANG, Y.; WANG, Z.; SUN Y.; ZHANG, W. Folding behaviors of purine riboswitch aptamers. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, v. 23, n. 1, p. 43-50, 2018.

GU, Y.; XU, X.; WU, Y.; NIU, T.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; LIU, L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 109-121, 2018.

GUIL, S.; ESTELLER, M. Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 19, n. 11, p. 1068-1075, 2012.

HARWOOD, C. R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 247-256, 1992. DOI: 10.1016/0167-7799(92)90233-l .

HELMLING, C.; KLÖTZNER, D. P.; SOCHOR, F.; MOONEY, R. A.; WACKER, A.; LANDICK, R.; FÜRTIG, B.; HECKEL, A.; SCHWALBE, H. Life times of metastable states guide regulatory signaling in transcriptional riboswitches. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 944, 2018.

HEMBERGER. S.; PEDROLLI, D. B.; STOLZ, J.; VOGL, C.; LEHMANN, M.; MACK, M. RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 119, 2011. DOI: 10.1186/1472-6750-11-119.

HU, G.; MA, A.; WANG, J. Ligand selectivity mechanism and conformational changes in guanine riboswitch by molecular dynamics simulations and free energy calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, p. 918-928, 2017.

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

KING, A.M.; VANDERPOOL, C. K.; DEGNAN, P.H. sRNA target prediction organizing tool (spot) integrates computational and experimental data to facilitate functional characterization of bacterial small RNAs. **mSphere**, v. 4, n. 1, 2019. DOI: 10.1128/mSphere.00561-18.

LEDESMA-AMARO, R.; BUEY, R. M.; REVUELTA, J. L. Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in *Ashbya gossypii*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 58, 2015. DOI: 10.1186/s12934-015-0234-4.

LEMAY, J. F.; PENEDO, J. C.; TREMBLAY, R.; LILLEY, D. M. J..; LAFONTAINE, D. A. Folding of the adenine riboswitch. **Chemistry & Biology**, v. 13, p. 857-868, 2006. DOI: 10.1016/j.chembiol.2006.06.010.

LOU, C.; STANTON, B.; CHEN, Y.J.; MUNSKY, B.; VOIGT, C. A. Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 1137-1142, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2401.

MACK, M.; VAN LOON, A. P.; HOHMANN, H. P. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 950-955, 1998.

MANDAL, M.; BOESE, B.; BARRICK, J. E.; WINKLER, W. C.; BREAKER, R. R. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 577-586, 2003.

MANDAL, M.; BREAKER, R. R. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 29-35, 2003.

MARS, R. A. T.; NICOLAS, P.; CICCOLINI, M.; REILMAN, E.; REDER, A.; SCHAFFER, M.; MÄDER, U.; VÖLKER, U.; VAN DIJL, J. M.; DENHAM, E. L. Small regulatory RNA-induced growth rate heterogeneity of *Bacillus subtilis*. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 3, 2017.

MARS, R. A. T.; NICOLAS, P.; DENHAM, E. L.; VAN DIJL, J. M. Regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*: a Gram-positive perspective on bacterial RNA-mediated regulation of gene expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 4, p. 1029-1057, 2016.

MATERN, A.; PEDROLLI, D.; GROßHENNIG, S.; JOHANSSON, J.; MACK, M. Uptake and metabolism of antibiotics roseoflavin and 8-demethyl-8-aminoriboflavin in riboflavin-auxotrophic *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 23, p. 3233-3243, 2016.

MORGADO, S. M.; VICENTE, A. C. P. Beyond the limits: tRNA array units in *Mycobacterium* genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1042, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01042.

MULHBACHER, J.; BROUILLETTE, E.; ALLARD, M.; FORTIER, L. C.; MALOUIN, F.; LAFONTAINE, D. A. Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-11, 2010.

NA, D.; YOO, S. M.; CHUNG, H.; PARK, H.; PARK, J. H.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 170-174, 2013.

NIELSEN, A. A. K.; DER, B. S.; SHIN, J.; VAIDYANATHAN, P.; PARALANOV, V.; STRYCHALSKI, E. A.; ROSS, D.; DENSMORE, D.; VOIGT, C. A. Genetic circuit design automation. **Science**, v. 352, 2016. DOI: 10.1126/science.aac7341.

NYGAARD, P.; SAXILD, H. H. The purine efflux pump PbuE in *Bacillus subtilis* modulates expression of the PurR and G-box (XptR) regulons by adjusting the purine base pool size. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 791-794, 2005.

PEDROLLI, D. B.; KÜHM, C.; SÉVIN, D. C.; VOCKENHUBER, M. P.; SAUER, U.; SUESS, B.; MACK, M. A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in *Bacillus subtilis*. **PNAS**, v. 112, n. 45, p. 14054-14059, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1515024112.

PEDROLLI, D. B.; LINS, M. R. C. R.; CORREA, G. G. **Introdução ao universo dos non-coding RNA**. 1. ed., Ribeirão Preto: Editora da Sociedade Brasileira de Genética, 2017. cap. 2, seção 13, p. 84-88.

PORTER, E. B.; MARCANO-VELÁZQUEZ, J. G.; BATEY, R. T. The purine riboswitch as a model system for exploring RNA biology and chemistry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1839, p. 919-930, 2014.

QIN, L. S.; ARKIN, A. P. A versatile framework for microbial engineering using synthetic noncoding RNAs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 341-354. DOI: 10.1038/nrmicro3244.

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

REVUELTA, J. L.; LEDESMA-AMARO, R.; LOZANO-MARTINEZ, P.; DÍAZ-FERNÁNDEZ, D.; BUEY, R. M.; JIMÉNEZ, A. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 44, p. 659-665, 2017.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Technical note: A new high-performance liquid chromatography purine assay for quantifying microbial flow. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1177-1181. DOI: 10.3168/jds.2008-1479.

RODRIGO, G.; JARAMILLO, A. RiboMaker: computational design of conformation-based riboregulation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 17, p. 2508-2510, 2014.

ROßMANITH, J.; NARBERHAUS, F. Modular arrangement of regulatory RNA elements. **RNA Biology**, v. 14, n. 3, p. 287-292, 2017. DOI: 10.1080/15476286.2016.1274853.

ROSTAIN, W.; LANDRAIN, T. E.; RODRIGO, G.; JARAMILLO, A. Regulatory RNA design through evolutionary computation and strand displacement. **Methods in Molecular Biology**, v. 1244, p. 63-78, 2014.

SAXILD, H. H.; BRUNSTEDT, K.; NIELSEN, K. I.; JARMER, H.; NYGAARD, P. Definition of the *Bacillus subtilis* PurR Operator Using Genetic and Bioinformatic Tools and Expansion of the PurR Regulon with *glyA, guaC, pbuG, xpt-pbuX, yqhZ-folD* and *pbuO*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6175-6183, 2001.

SCHWECHHEIMER, S.; SCHWECHHEIMER, K.; PARK, E. Y.; REVUELTA, J. L.; BECKER, J.; WITTMANN, C. Biotechnology of riboflavin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2107-2119, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-7256-z.

SERGANOV, A.; YUAN, Y.; PIKOVSKAYA, O.; POLONSKAIA, A.; MALININA, L.; PHAN, A.; HOBARTNER, C.; MICURA, R.; BREAKER, R. R.; PATEL, D. J. Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. **Chemistry & Biology**, v. 11, n. 12, p. 1729-1741, 2004.

SHERLOCK, M. E.; SUDARSAN, N.; STAV, S.; BREAKER, R. R. Tandem riboswitches form a natural Boolean logic gate to control purine metabolism in bacteria. **eLife**, 7:e33908, 2018. DOI: 10.7554/eLife.33908.

SHERWOOD, A. V.; HENKIN, T. M. Riboswitch-mediated gene regulation: novel RNA architectures dictate gene expression responses. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, p. 361-374, 2016.

SHI, T.; WANG, Y.; WANG, Z.; WANG, G.; LIU, D.; FU, J.; CHEN, T.; ZHAO, X. Deregulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin biosynthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 101, 2014.

STAHMANN, K. P.; REVUELTA, J. L.; SEULBERGER, H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata* or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 509-516, 2000.

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

WICKISER, J. K.; CHEAH, M. T.; BREAKER, R. R.; CROTHERS, D. M. The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. **Biochemistry**, v. 44, p. 13404-13414, 2005.

YANG, S.; WANG, Y.; WEI, C.; LIU, Q.; JIN, X.; DU, G.; CHEN, J.; KANG, Z. A new sRNA-mediated posttranscriptional regulation system for *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 2986-2995, 2018.

YOO, S. M.; NA, D.; LEE, S. Y. Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in *Escherichia coli*. **Nature Protocols**, v. 8, n. 9, p. 1694-1707, 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.105.

ZADEH, J. N.; STEENBERG, C. D.; BOIS, J. S.; WOLFE, B. R.; PIERCE, M. B.; KHAN, A. R.; DIRKS. R. M.; PIERCE, N. A. NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, p. 170-173, 2010.