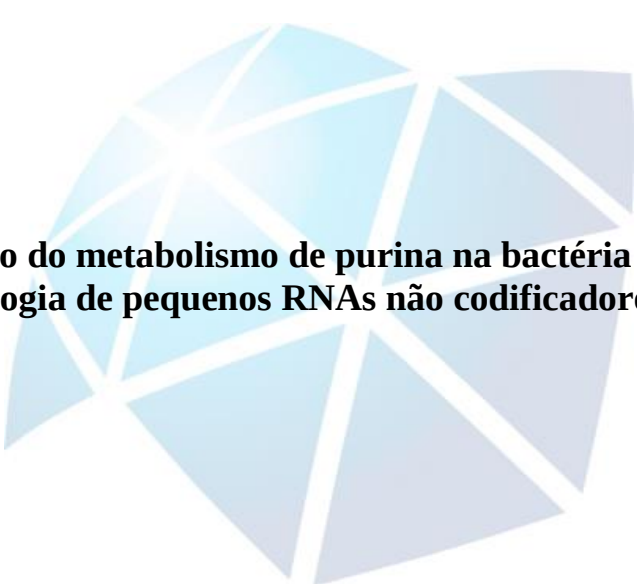




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

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.

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 todyinho, 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 B₂ (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 *ribDG* 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 B₂ (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 *ribDG* 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-fosforibosil-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 <i>B. subtilis</i> : síntese <i>de novo</i> 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 <i>riboswitches</i>	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 <i>B. subtilis</i> , cuja expressão é regulada pelo <i>riboswitch ribDG</i>	27
Figura 4- Representação da estrutura dos <i>riboswitches</i> de purinas na região 5' UTR de um mRNA: aptâmero [região receptora de guanina (G) ou adenina (A)] e plataforma de expressão (formação de <i>hairpin</i> terminador ou antiterminador). A: <i>Riboswitch</i> de guanina: quando há G em altas concentrações, este se liga ao aptâmero e impede a transcrição do gene <i>downstream</i> (OFF). B: <i>Riboswitch</i> 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 <i>riboswitches</i> de guanina (<i>purE</i> , <i>xpt</i> e <i>nupG</i>), adenina (<i>pbuE</i>) e FMN (<i>ribDG</i>) em fusão transcricional com o gene da luciferase de vagalume <i>luc</i>	35
Figura 6- Esquema para avaliação da expressão gênica <i>in vitro</i> desenvolvida em nosso estudo para avaliar a funcionalidade dos <i>riboswitches</i> de purinas e FMN	38
Figura 7- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem dos <i>riboswitches</i> de purina e FMN contendo os sítios de restrição padrão <i>Biobrick</i> (E: <i>EcoRI</i> , X: <i>XbaI</i> , S: <i>SpeI</i> e P: <i>PstI</i>), o cassete do gene <i>rfp</i> e de resistência para cloranfenicol <i>cat</i> , operon <i>luxABCDE</i> como repórter e integra em <i>Bacillus subtilis</i> no locus <i>sacA</i>	39
Figura 8- Representação do sistema idealizado neste trabalho para caracterização <i>in vivo</i> dos <i>riboswitches</i> que regulam genes do metabolismo em <i>Bacillus subtilis</i> . O plasmídeo pBS3Clux contendo o promotor <i>Psrfa</i> ou <i>Pveg</i> que controla a transcrição dos <i>riboswitches</i> de guanina (<i>purE</i> , <i>xpt</i> e <i>nupG</i>), adenina (<i>pbuE</i>) e FMN (<i>ribDG</i>) e operon <i>luxABCDE</i> responsável pela bioluminescência. BBp: <i>Biobrick</i> prefixo; BBs: <i>Biobrick</i> 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 <i>riboswitches</i> de purina presentes em <i>B. subtilis</i> . 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 <i>riboswitch</i> de purina (aptâmero e plataforma de expressão) e a localização da <i>seed site</i> , 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 <i>Biobrick</i> (E: <i>EcoRI</i> , X: <i>XbaI</i> , S: <i>SpeI</i> e P: <i>PstI</i>), o cassete do gene <i>rfp</i> e de resistência para eritromicina <i>erm</i> e integra em <i>Bacillus subtilis</i> no locus <i>lacA</i>	44
Figura 12- Representação da segunda unidade de transcrição contendo o sRNA específico projetado para os <i>riboswitches</i> de purinas e FMN sendo regulado pelo promotor <i>grac</i> , integrado ao locus <i>lacA</i> em <i>Bacillus subtilis</i> que contém o sistema <i>riboswitch</i> -operon <i>lux</i> nos genomas	44
Figura 13- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem do sistema sRNA-RNA-Broccoli contendo os sítios de restrição padrão <i>Biobrick</i> (E: <i>EcoRI</i> , X: <i>XbaI</i> , S: <i>SpeI</i> e P: <i>PstI</i>), o cassete do gene <i>rfp</i> e de resistência para cloranfenicol <i>cat</i> e integra em <i>Bacillus subtilis</i> no locus <i>amyE</i>	46
Figura 14- Caracterização <i>in vitro</i> da funcionalidade do <i>riboswitch purE</i> na presença de guanina e adenina variando as concentrações 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 <i>in vitro</i> da funcionalidade dos <i>riboswitches</i> . A-D: <i>riboswitches</i> de purina; E: <i>riboswitch</i> de FMN <i>ribDG</i> . 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 <i>Bacillus subtilis</i> integrado com <i>Promotor-luxABCDE</i> 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 <i>B. subtilis</i> integrado com <i>purE/luxABCDE</i> (A), <i>xpt/luxABCDE</i> (B), <i>nupG/luxABCDE</i> (C) e <i>pbuE/luxABCDE</i> (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 <i>riboswitch purE</i> . 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 <i>riboswitch purE</i> -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 <i>in silico</i> . 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 μ M) 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 (μ M) com concentrações variando entre 0,024 a 6,25 μ M, 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(<i>ribDG</i>)	77
Figura 28- Curva de crescimento (DO600) versus leitura de fluorescência (unidade arbitrária) do <i>B. subtilis</i> ::sRNA(<i>purE</i>)-RNA-Broccoli. Após 130 minutos de cultivo, foi adicionado IPTG e o fluoróforo DFHBI	78
Figura 29- Fluorescência, em unidade arbitrária, produzida por <i>B. subtilis</i> ::sRNA(<i>purE</i>)-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 <i>riboswitch purE</i> -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 <i>in silico</i> 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 <i>B. subtilis</i> 168 selvagem, <i>B. subtilis</i> :: <i>purE</i> / <i>luxABCDE</i> ::2E sem o sRNA(controle), <i>B. subtilis</i> reprogramado com o sRNA(<i>purE</i>) e <i>B. subtilis</i> reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA(<i>purE</i>). B: Taxa de ativação da expressão gênica causada pelo sRNA <i>purE</i> e RiboJ-sRNA(<i>purE</i>), calculada pela razão entre os valores de bioluminescência normalizados de <i>B. subtilis</i> expressando o sRNA(<i>purE</i>) e RiboJ-sRNA(<i>purE</i>) por <i>B. subtilis</i> controle sem sRNA	82
Figura 32- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em horas) de <i>B. subtilis</i> 168 selvagem, <i>B. subtilis</i> :: <i>purE</i> / <i>luxABCDE</i> ::sRNA(<i>purE</i>), <i>B. subtilis</i> reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA(<i>purE</i>) e <i>B. subtilis</i> :: <i>xpt</i> / <i>luxABCDE</i> ::RiboJ-sRNA(<i>purE</i>) como controle. B: Taxa de ativação da expressão gênica calculada pela razão entre os valores de bioluminescência normalizados de <i>B. subtilis</i> 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 <i>B. subtilis</i> ::2E (controle sem sRNA), <i>B. subtilis</i> reprogramado com o sRNA(<i>purE</i>) e <i>B. subtilis</i> reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA(<i>purE</i>). 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 <i>B. subtilis</i> ::sRNA(<i>purE</i>) e <i>B. subtilis</i> ::RiboJ-sRNA(<i>purE</i>) em comparação com o controle sem o sistema de sRNA sintético	88
Figura 37- Operon idealizado contendo todos os sRNAs e RiboJs em <i>tandem</i> visando a construção da linhagem de <i>Bacillus subtilis</i> 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 <i>riboswitches</i> 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 cassette de resistência. AMP: ampicilina (100 µg/mL)	52
Tabela 4- Lista de linhagens de <i>B. subtilis</i> geradas neste estudo com a descrição das características e cassette 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 <i>riboswitches</i> de guanina, adenina e FMN em <i>Bacillus subtilis</i>	64
Tabela 6- Sequência da RiboJ a qual foi fusionada com o sRNA desenhado para interferir na regulação do <i>riboswitch</i> de guanina <i>purE</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5' UTR	Região 5' não-traduzida
2E	Plasmídeo pBS2E quando integrado ao cromossomo de <i>B. subtilis</i>
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BBp	<i>Biobrick</i> prefixo
BBs	<i>Biobrick</i> sufixo
BSA	Albumina de soro bovino
CaCl₂	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	<i>Generally reconized as safe</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HClO₄	Ácido perclórico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMP	Inosina 5'-monofosfato
IPTG	Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
K₂HPO₄·3H₂O	Fosfato de potássio dibásico trihidratado
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MgSO₄·7H₂O	Sulfato de magnésio trihidratado
MnSO₄·H₂O	Sulfato de manganês monohidratado
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
ncRNAs	RNAs não codificadores
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amônio
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
RFP	<i>Red Flourescent Protein</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SOC	Meio de cultura líquido <i>Super optimal</i> 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
ZnCl₂	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
R²	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 <i>Bacillus subtilis</i> 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 <i>Bacillus subtilis</i> .	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 <i>Riboswitches</i>	29
3 OBJETIVO	33
3.1 Objetivos específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Caracterização dos <i>riboswitches</i> de purinas e FMN	34
4.1.1 Desenvolvimento de método para expressão gênica <i>in vitro</i>	34
4.1.2 Clonagem dos <i>riboswitches</i> em plasmídeos replicativos	35
4.1.3 Expressão gênica <i>in vitro</i> dos <i>riboswitches</i>	36
4.1.4 Integração dos <i>riboswitches</i> no cromossomo de <i>Bacillus subtilis</i>	38
4.1.5 Funcionalidade e caracterização <i>in vivo</i> das linhagens de <i>B. subtilis</i>	40
4.2 Caracterização dos pequenos RNAs sintéticos	41
4.2.1 Design e avaliação <i>in silico</i> dos sRNAs	41
4.2.2 Expressão gênica <i>in vitro</i> dos sistemas <i>riboswitch</i> -sRNA	43
4.2.3 Integração dos sRNAs no cromossomo de <i>B. subtilis</i>	44
4.2.4 Funcionalidade do sistema em <i>B. subtilis</i> 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 <i>Scale-up</i> de <i>B. subtilis</i> reprogramados com sRNA e RiboJ-sRNA	48
4.3.4 Quantificação de guanina e adenina produzidas pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> 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 <i>in vitro</i> de <i>riboswitches</i>	58
5.4. Caracterização da funcionalidade dos <i>riboswitches</i>	59
5.4.1 Expressão gênica <i>in vitro</i>	59
5.4.2 Funcionalidade <i>in vivo</i> dos <i>riboswitches</i> em <i>Bacillus subtilis</i>	61
5.5 Pequenos RNAs sintéticos como ferramenta de riborregulação	64
5.5.1 Design e avaliação <i>in silico</i> dos sRNAs	64
5.5.2 Funcionalidade dos sRNAs <i>in vitro</i>	67
5.5.3 Ensaio preliminar <i>in vivo</i> com sRNA(<i>purE</i>)	69
5.5.4 Ensaios <i>in vivo</i> dos sRNAs em <i>B. subtilis</i>	69
5.5.5 Ensaios <i>in vivo</i> so sRNA desenhado para o <i>riboswitch ribDG</i>	75
5.6 Modelo funcional de sRNA(<i>purE</i>) para reprogramação do metabolismo de purinas em <i>Bacillus subtilis</i>	78
5.6.1 Estabilidade do sRNA(<i>purE</i>) transcrito na célula	78
5.6.2 RiboJ como sequência não-traduzida e estabilizadora do sRNA(<i>purE</i>)	79

5.6.3 <i>Scale-up</i> de <i>B. subtilis</i> reprogramado com RiboJ-sRNA(<i>purE</i>)	82
5.6.4 Quantificação de guanina e adenina produzidas pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> reprogramadas com sRNA(<i>purE</i>) e RiboJ-sRNA(<i>purE</i>) por Cromatografia Líquida de Alta Performance 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 sistemas 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 B₂ (riboflavina).

2 REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento, primeiro das técnicas de biologia molecular e mais recentemente de biologia sintética, têm proporcionado variadas possibilidades de desenvolvimento racional de processos biológicos mais eficientes para atender demandas industriais.

Os nucleotídeos de purina são importantes produtos biotecnológicos e mais de 22.000 toneladas de GMP (guanosina 5'-monofosfato) e IMP (inosina 5'-monofosfato) foram produzidas em 2010 nas indústrias de alimentos em todo o mundo. Os nucleotídeos de purina aumentam o sabor de alguns aminoácidos. Por exemplo, o sabor característico do L-glutamato é intensificado pela adição de nucleotídeos de purina. As espécies bacterianas do gênero *Bacillus* ou *Corynebacterium* são utilizadas como organismos para a produção fermentativa de nucleotídeos de purina. As linhagens produtoras clássicas foram construídas por mutagênese aleatória através de seleção utilizando análogos de purina tóxicos (LEDESMA-AMARO; BUEY; REVUELTA, 2015).

Já a riboflavina (vitamina B₂) é um componente vital dos alimentos. O bem-sucedido processo biotecnológico para a produção de riboflavina mostra o potencial da produção de vitaminas por via fermentativa e representa um marco na biotecnologia branca. Um processo biotecnológico mais rentável, baseado na utilização de matérias-primas renováveis e sustentáveis, substituiu completamente a produção sintética de riboflavina (SCHWECHHEIMER et al., 2015).

A crescente demanda por nucleotídeos de purina e riboflavina força as indústrias a trabalharem constantemente na melhoria dos processos existentes. Técnicas inovadoras como as descritas neste trabalho podem contribuir para esta garantia.

2.1 Por que usar a bactéria *Bacillus subtilis* como chassis de produção?

B. subtilis é considerada uma bactéria com características ideais para uso industrial na produção de enzimas e proteínas funcionais. Vários sistemas para expressão heteróloga em *Bacillus* estão sendo contruídos pela conveniência de sua fácil manipulação genética com alto rendimento do produto em questão além de apresentar rápido crescimento (CAI et al., 2019).

B. subtilis é um microrganismo facilmente manipulável em condições de laboratório e na literatura, há descrição de diversas técnicas de biologia molecular específicas para este microrganismo (DUBNAU, 1991; HARWOOD, 1992; BRON et al., 1999). Esta bactéria é considerada GRAS (*Generally reconized as safe*), ou seja, sua manipulação e os produtos

derivados da fermentação desta bactéria são caracterizados e reconhecidamente seguros, se tornando um chassi de interesse na biologia sintética.

Além disto, vários metabolismos e suas vias/conversões metabólicas que ocorrem na célula de *B. subtilis* são conhecidos e, portanto, esta bactéria torna-se um portfólio interessante para melhoramento da produção de metabólitos com potencial industrial utilizando abordagens como a biologia sintética ou biologia sistêmica.

2.2 Biologia sintética e o uso de ferramentas computacionais

Comumente são empregadas ferramentas da biologia molecular, como *knockout* (deleção) ou inserção de genes, para se descobrir qual o papel de um determinado gene numa célula microbiana. Essas técnicas, apesar de bem utilizadas, possuem desvantagens quando se tratam de genes vitais ao crescimento microbiano. Com a biologia sintética, a criação de *toolboxes* para regulação da expressão gênica tem sido crucial para descoberta da função destes genes (YANG et al., 2018).

É fato que células podem ser reprogramadas usando circuitos genéticos sintéticos, contendo reguladores organizados para gerar uma ação desejada. Utilizando abordagens como a biologia sintética, é possível reprogramar racionalmente células para executar variadas funções (NIELSEN et al., 2016)

Softwares foram programados para facilitar o emprego da biologia sintética. Por exemplo, o *RNA Target Prediction Organizing Tool (SPOT)* (KING; VANDERPOOL; DEGNAN, 2019) foi programado para encontrar possíveis RNAs pequenos com função de regulação em genes de bactérias. Assim como, o NUPACK (ZADEH et al., 2010) e o Ribomaker Absynth (RODRIGO; JARAMILLO, 2014; ROSTAIN et al., 2014) foram pensados para simular interações de fitas de DNA ou RNA, assim como desenhar e projetar RNAs com função riborreguladora.

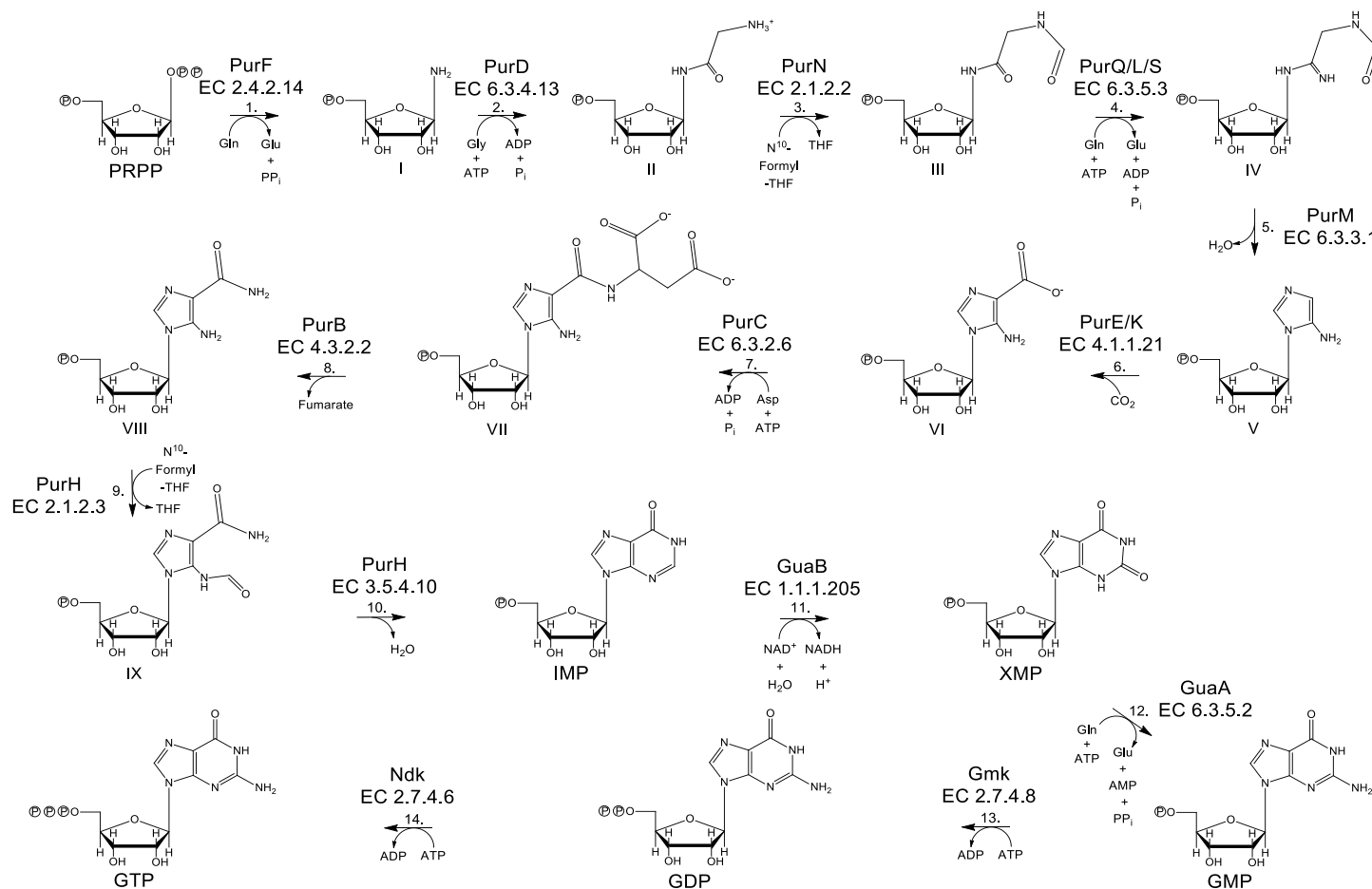
2.3 Metabolismo de purinas e regulação da expressão gênica em *Bacillus subtilis*

Nucleotídeos de purina estão envolvidos em diversas vias metabólicas tornando-os metabólitos essenciais na fisiologia celular de microrganismos. As purinas são componentes estruturais de DNA e RNA, e estão envolvidas em processos como a síntese de ácidos nucléicos e biossíntese de aminoácidos, sendo também utilizadas como carreadores e suplementos de energia para a célula na forma de ATP (adenosina trifosfato) e GTP

(guanosina trifosfato). As purinas ainda são precursoras em vias metabólicas de aminoácidos e vitaminas, como ácido fólico e riboflavina, que possuem interesse na indústria farmacêutica (SHI et al., 2014).

Em *B. subtilis*, o metabolismo de purina é responsável tanto pela importação de purinas do meio extracelular, como pela síntese *de novo*. Na figura 1, está esquematizado a produção de GTP (guanosina trifosfato) a partir do precursor PRPP (5-fosforibosil-1-pirofosfato) e as proteínas envolvidas na via biossintética.

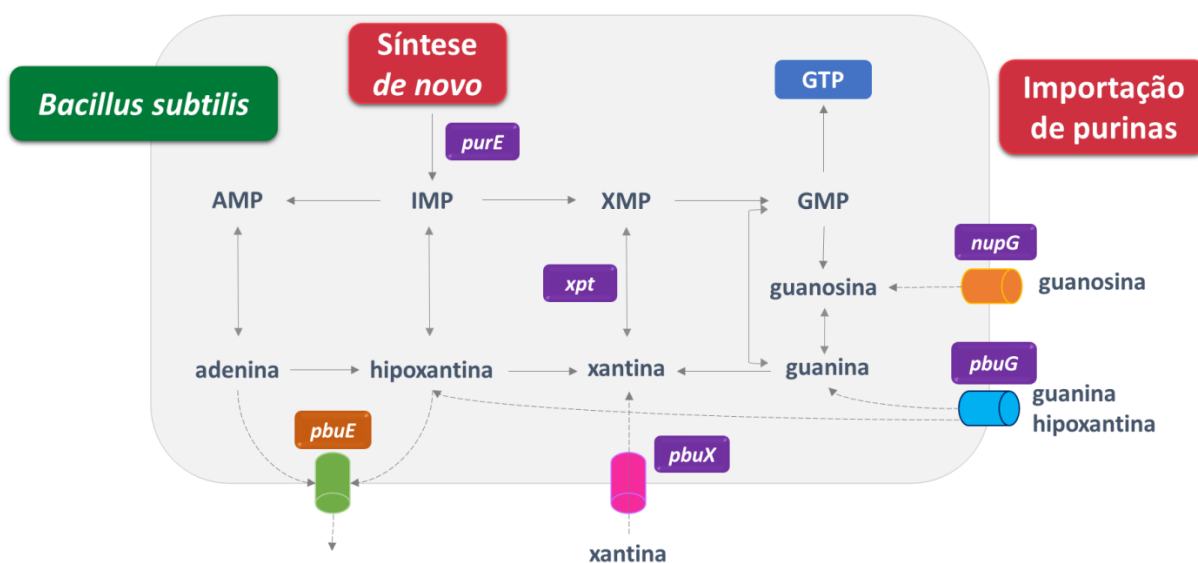
Figura 1- Biossíntese de purina em bactérias. As etapas enzimáticas de 1 a 14 são responsáveis pela conversão de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a GTP. [I] 5-fosfo-D-ribosil-amina; [II] 5-fosfo-ribosil-glicineamida; [III] 5-fosforibosil-N-formilglicineamida; [IV] 5-fosforibosil-N-formilglicineamidina; [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.



Fonte: Ebbola e Zalkin (1987).

Os genes da via biossintética encontram-se organizados no operon *pur* (*purEKBKCSQLFMNHD*), responsável pela síntese de inosina monofosfato (IMP). Três outros genes (*purA*, *guaA* e *guaB*), envolvidos na síntese de GTP e ATP, encontram-se isolados no cromossomo (EBBOLE; ZALKIN, 1987; SAXILD et al., 2001). A importação de purinas em *B. subtilis* é realizada por permeases codificadas por *nupG*, *pbuG* e *pbuX*, sendo que o último gene é parte do operon *xpt-pbuX* que também codifica a enzima xantina fosforibosiltransferase. Além das permeases citadas, *B. subtilis* possui uma proteína excretora de purinas codificada pelo gene *pbuE*, a qual é produzida toda vez que a concentração intracelular de purinas se eleva (Figura 2) (NYGAARD; SAXILD, 2005).

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*.



Fonte: adaptado de Mulhbacher et al. (2010) e Nygaard e Saxild (2005).

O metabolismo de purina em *B. subtilis* é controlado por mecanismo de regulação do término prematuro da transcrição com emprego de *riboswitches* de purina. O término da transcrição é determinado pela concentração intracelular de guanina e adenina. Os operons *pur* e *xpt-pbuX* e os genes *nupG* e *pbuG* têm sua transcrição prematuramente terminada em resposta a altas concentrações de guanina, cessando assim tanto a biossíntese quanto a importação de purinas (MANDAL et al., 2003). Por outro lado, *pbuE* é positivamente regulado por adenina, ou seja, a transcrição só prossegue na presença de alta concentração de

adenina, ativando assim a síntese da proteína excretora de purinas PbuE (MANDAL; BREAKER, 2003).

Um outro mecanismo para regulação deste metabolismo, revela-se com a produção da proteína reguladora PurR. Esta proteína produzida por *B. subtilis* tem a função de regular negativamente a expressão de genes envolvidos na biossíntese de purinas, do próprio gene *purR* e genes para transporte de purinas. A proteína PurR é um homodímero de 62 kDa e, após análises de deleção do gene *purR*, foi observado que a proteína interage com o DNA numa região entre os nucleotídeos -147 e -21 em relação ao local de início da transcrição no operon *pur* (BERA et al., 2003).

Do ponto de vista biotecnológico, o metabolismo de purina pode ser considerado uma peça chave com grande potencial para manipulação, pois além de alimentar a biossíntese das moléculas acima citadas, os próprios intermediários gerados na via biossintética de purinas apresentam valor biotecnológico. Como exemplo podem ser citados adenosina, guanosina, inosina e hipoxantina, que podem tanto ser usadas como aditivos em alimentos, como servir de precursores para síntese de drogas pela indústria farmacêutica.

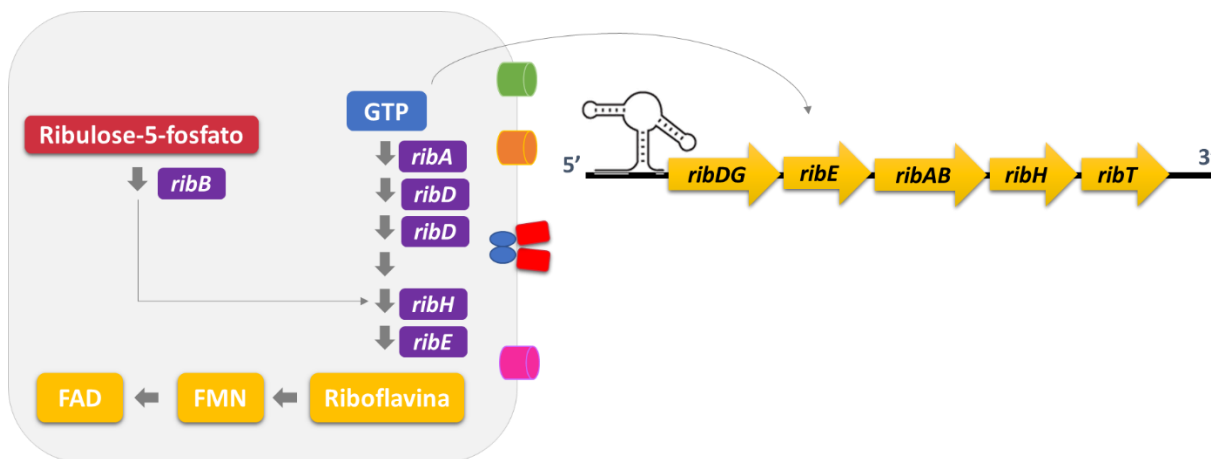
2.4 Produção da Riboflavina (vitamina B₂) a partir do metabolismo de purinas

A riboflavina é amplamente produzida na área farmacêutica, de alimentos e também para cosmética. A produção industrial de riboflavina inicialmente era feita por síntese química. Atualmente, algumas cepas industriais de *B. subtilis* e *Ashbya gossypii* (fungo filamentoso) já são conhecidas e foram obtidas por técnicas de mutagênese. Entretanto, elas possuem limitações no que concerne o crescimento e quantidade do produto (REVUELTA et al., 2017; GU et al., 2018).

B. subtilis produtor de riboflavina foi obtido a partir de mutagenização gerando mutantes resistentes a purinas ou análogos da riboflavina. Após algumas seleções, houve o problema de limitação de crescimento populacional, e assim, novas técnicas estão sendo estrategicamente investigadas para obtenção de estirpes robustas (REVUELTA et al., 2017).

Em *B. subtilis*, a riboflavina é sintetizada por algumas reações enzimáticas a partir de GTP e ribulose-5-fosfato. O GTP é um dos produtos do metabolismo de purinas, podendo sugerir que um aumento de purinas no meio intracelular de um microrganismo, poderia aumentar a produção de riboflavina. A maioria das bactérias é capaz de sintetizar esta vitamina, no entanto, algumas espécies dependem de riboflavina externa utilizando sistemas de transporte de flavinas (Figura 3) (GARCÍA-ANGULO, 2017).

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*.



Fonte: adaptado de García-Angulo (2017).

A riboflavina é um precursor direto das formas ativas flavina 5'-monofosfato (FMN) e flavina-adenina dinucleotídeo (FAD). O operon da riboflavina contém os genes *ribDG*, *ribE*, *ribAB*, *ribH* e *ribT* de *B. subtilis*, que formam uma unidade de transcrição, e a região 5' UTR não traduzida do mRNA com o *riboswitch* (*ribDG*), que regula a expressão destes genes. O sistema regulador dos genes neste operon depende do nível citoplasmático de FMN, ocorrendo o término precoce da transcrição quando os níveis de FMN são altos, os quais se ligam ao aptâmero gerando um terminador na plataforma de expressão (HEMBERGER et al., 2011; PEDROLI et al., 2015).

A produção mundial de riboflavina por via biotecnológica é atualmente liderada pelas empresas ADM norte-americana, a alemã BASF e a suíça Roche, as quais aplicam três diferentes bioprocessos utilizando a levedura *Candida famata*, o fungo *Ashbya gossypii* e *B. subtilis*, respectivamente. O melhoramento dos três microrganismos foi inicialmente realizado selecionando linhagens resistentes a antimetabólitos (STAHMANN; REVUELTA; SEULBERGER, 2000). Posteriormente, deleções e inserções de genes possibilitaram adicional melhoria na produtividade de riboflavina pelas três linhagens.

A linhagem de *B. subtilis* possui duas mutações causadas pela seleção com a antivitamina roseoflavina. Uma mutação pontual no gene *ribC* leva à produção de uma flavoquinase com atividade reduzida a 1% em comparação ao tipo selvagem, provocando uma drástica redução na reação de fosforilação da riboflavina (MACK; VAN LOON; HOHMANN, 1998). Nesta linhagem, o operon contendo os genes da via biossintética da

riboflavina teve seu promotor natural trocado pelo promotor *veg*, um promotor constitutivo e forte em *B. subtilis* e, adicionalmente, mutação do gene *tkl*, o qual codifica uma transketolase menos ativa, gerando acúmulo de ribulose-5-fosfato, precursor da biossíntese de riboflavina.

De acordo com Abbas e Sibirny (2011), ainda há muito a ser feito para melhorar a produção de riboflavina por via biotecnológica. A baixa produtividade é, aparentemente, o problema mais importante, pois geralmente não mais que 4,0% da fonte de carbono é convertida em riboflavina pelas linhagens disponíveis. Para leveduras e bactérias, a instabilidade genética é ainda uma preocupação adicional, podendo comprometer o processo produtivo.

2.5 RNAs não-codificadores (ncRNAs)

A perspectiva sobre o mundo dos RNAs mudou drasticamente pela descoberta de funções essenciais na regulação de diversos genes. Não só as proteínas tem papel regulatório, mas também moléculas de RNAs, a quais são extremamente flexíveis e de estrutura diversificada, permitindo sua participação em vários mecanismos regulatórios (MARS et al., 2016).

O uso de módulos de RNAs reguladores se torna cada vez mais atrativo pela biologia sintética devido às suas estruturas secundárias fáceis de projetar e manipular, podendo atingir uma diversidade enorme de sequência, estrutura e função. Além disto, possuem como característica a modularidade, atuando como partes ou sequências de nucleotídeos capazes de permanecer com suas funções independentemente das combinações, tornando-os um sistema poderoso para a concepção racional de novas ferramentas de regulação gênica (ROßMANITH; NARBERHAUS, 2017).

Diferentes tipos de RNAs não-codificadores (ncRNAs) podem regular a expressão de genes e se envolvem em processos celulares chave (GUIL; ESTELLER, 2012). Pequenos RNAs reguladores (sRNAs) são sequências não-codificadoras de RNAs que não são traduzidas em proteínas e podem controlar a expressão de um determinado gene alvo ao nível transcricional ou pós-transcricional, geralmente de modo *trans* (interação intermolecular) com pareamento Watson-Crick em regiões complementares de um mRNA (YOO; NA; LEE, 2013; MARS et al., 2017).

Regulação gênica por emprego de ncRNAs é um mecanismo naturalmente empregado por bactérias através de mecanismos diversos, desempenhando papel central na regulação da fisiologia celular. Pequenos RNAs reguladores (sRNA) compõem um grupo de RNAs não

codificadores formados por aproximadamente 50 a 250 nucleotídeos estruturados, podendo modular diretamente a atividade de proteínas ou ligar-se a mRNAs e regular a expressão gênica (WATERS; STORZ, 2009; IRNOV et al., 2010).

Dispositivos de ncRNAs têm sido selecionados *in vitro* ou racionalmente desenhados para monitorar e programar células, integrando sinais internos e/ou externos com processos celulares. As estruturas podem ser simuladas *in silico* através de softwares para avaliar RNAs energeticamente mais estáveis, aperfeiçoando o desenho racional e garantindo a função desejada (MARS et al., 2016).

Riboswitches sintéticos foram racionalmente desenhados para regular a expressão gênica respondendo à sinais bioquímicos, assim como, aptazimas (aptâmeros com ribozimas) também foram engenheiradas para sentir e modular a expressão de genes pelo padrão de clivagem após ligação de metabólitos ou peptídeos (QIN; ARKIN, 2014).

2.5.1 *Riboswitches*

Sequências de RNAs são utilizadas naturalmente como sistemas reguladores por diversos microrganismos. *Riboswitches* são uma classe desses RNAs reguladores que atuam em *cis* (interação intramolecular), também por pareamento Watson-Crick, entretanto, fazem parte do mRNA na região 5' UTR *upstream* ao gene que vão regular. Eles reconhecem um sinal biológico, geralmente ligando-se a um determinado metabólito, e respondem com mudança estrutural permitindo ou bloqueando a expressão do gene (PEDROLLI; LINS; CORREA, 2017; GONG et al., 2018).

Esta função dos *riboswitches* é atribuída a história evolutiva do mundo dos RNAs. Eles são capazes de prever e controlar o quanto que é necessário de RNA para uma determinada proteína ser produzida de acordo com as demandas metabólicas de um organismo (SHERLOCK et al., 2018).

Esses RNAs reguladores são capazes de regular a expressão gênica através da ligação direta a uma molécula pequena (ligante) sem a assistência de proteínas acessórias (BATEY, 2012). Este termo *riboswitch* foi estabelecido para definir RNAs que controlem a expressão de genes sem a necessidade de fatores de proteína (BREAKER, 2010).

Riboswitches atuam como reguladores da expressão gênica controlando a terminação da transcrição, a iniciação da tradução ou degradação do mRNA. Eles são capazes de detectar um sinal fisiológico e assim induzem mudanças na sua estrutura secundária, caracterizando-os entre dois estados distintos: quando ligados, a expressão de um gene ocorre; quando

desligados, a expressão é reprimida pelo sinal (o inverso também pode ocorrer) (AGHDAMA; HEJAZI; BARZEGAR, 2016; SHERWOOD; HENKIN, 2016; HELMLING et al., 2018).

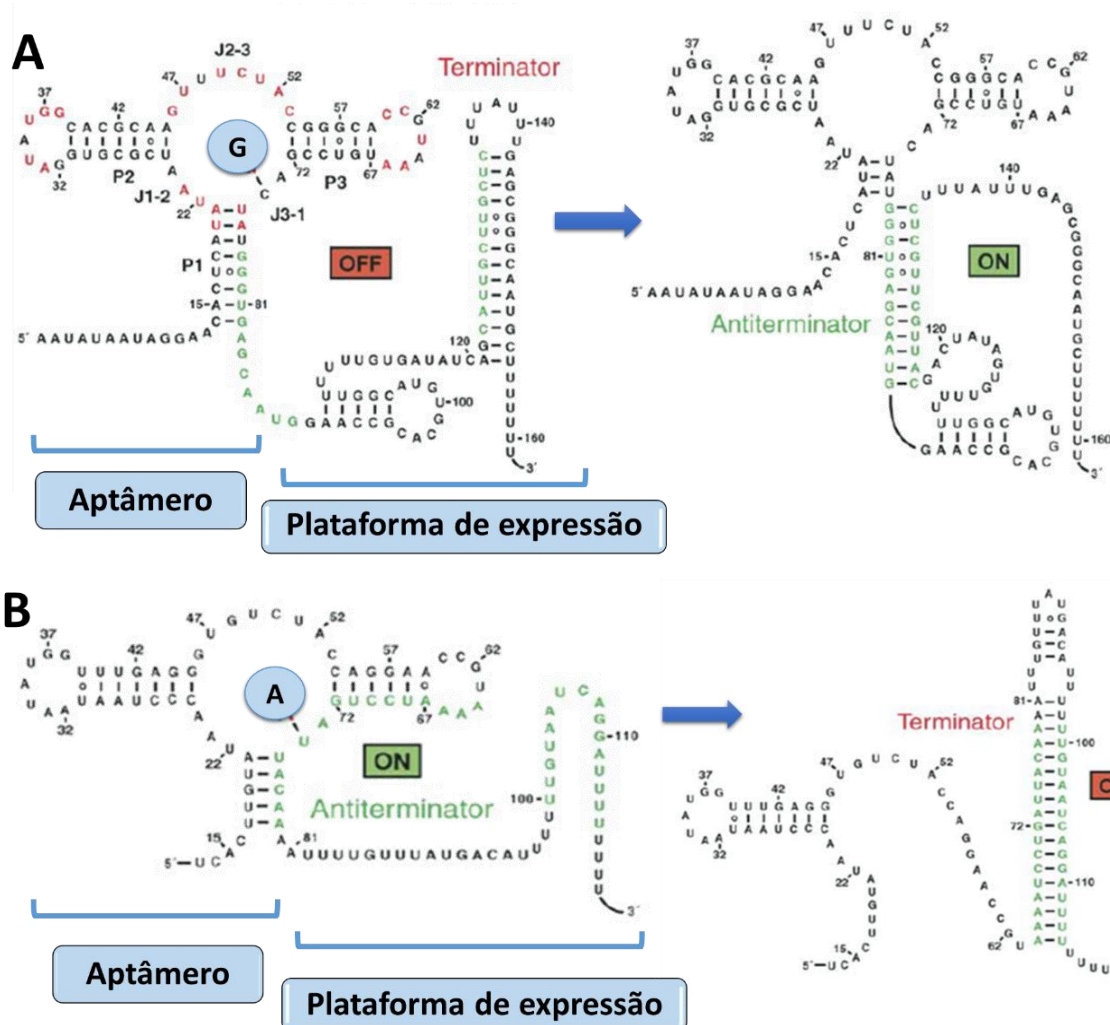
Existem outras classes de *riboswitches*, entretanto, a maior delas é a classe dos que se ligam a pequenos metabólitos como coenzimas, aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e íons. Estes metabólitos são sinais fisiológicos que geralmente são um dos produtos finais de uma via biossintética (SHERWOOD; HENKIN, 2016).

A sequência dos *riboswitches* é formada por dois domínios, o aptâmero que é definido como a sequência mínima de RNA necessária para atingir alta afinidade de ligação com o ligante e a plataforma de expressão, a qual contém o componente regulador com a estrutura *switch* e age ao nível transcricional ou traducional (PORTER et al., 2014). Durante a transcrição de um determinado gene, o *riboswitch* assume uma estrutura secundária (*folding*) quando ligado a um metabólito e adota outra forma quando não está ligado, e é essa mudança na conformação que determina a resposta reguladora. *Riboswitches* também desempenham um papel importante na estabilização do mRNA, portanto a supressão deste elemento regulador provoca degradação rápida do mRNA (GARST; EDWARDS; BATEY, 2011).

Em *B. subtilis*, os *riboswitches* de purinas estão localizados no mRNA em cinco unidades de transcrição separadas, que em conjunto codificam 17 genes principalmente envolvidos na biossíntese e transporte de nucleotídeos de purina (MANDAL et al., 2003). Os *riboswitches* de purina são os menores conhecidos até o momento. Apesar de possuírem elevada semelhança estrutural em relação aos aptâmeros, eles exibem especificidade muito elevada e afinidade para com os seus respectivos ligantes cognatos, adenina e guanina (LEMAY et al. 2006).

Especificamente, os *riboswitches* de purinas regulam a expressão gênica apenas terminando precocemente a transcrição do gene *downstream* no mRNA. A guanina ou adenina se ligam por pareamento Watson-Crick de forma canônica, gerando *hairpins* na plataforma de expressão denominados terminador ou antiterminador. A formação do terminador impede fisicamente que a RNA polimerase continue ancorada ao DNA molde e assim a transcrição é interrompida (Figura 4).

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.



Fonte: adaptado de Serganov et al. (2004).

O design e a utilização de pequenos RNAs não-codificadores (sRNAs) sintéticos podem ser utilizados para impedir a regulação dos *riboswitches* na via biossintética de purinas e riboflavina. A intenção deste trabalho foi o design destes sRNAs para pareamento na região do aptâmero, tornando os *riboswitches* incapazes de ligar o metabólito (purinas ou FMN) e impedindo assim a regulação do gene *downstream*. Esses sistemas *riboswitch*-sRNA constitui-se um novo modelo de controle do metabolismo celular microbiano, que pode ser amplamente aplicável e inovador. O ponto principal em utilizar a estratégia de sRNAs

sintéticos é que estes são capazes de modular a expressão gênica sem modificações a nível de genoma, e, portanto, não gera estresses metabólicos (NA et al., 2013).

A nova técnica para o controle da expressão de genes em microrganismos por meio de sRNAs que se ligam a *riboswitches* ainda não foi utilizada para otimizar linhagens industriais. Estas linhagens também terão potencial para serem usadas na produção de químicos básicos com base em matérias-primas renováveis, produtos químicos finos. A reprogramação do controle da biossíntese de purina em *B. subtilis* é um conceito que pode ser usado diretamente para melhorar as linhagens industriais para a produção de nucleotídeos de purina e também de riboflavina.

Um dos precursores diretos da riboflavina no metabolismo das bactérias é o nucleotídeo de purina GTP. Por esta razão, a melhoria na produtividade de nucleotídeos de purina está também diretamente ligada a uma maior produtividade de riboflavina, podendo também ser utilizada para a otimização da síntese biológica de riboflavina.

Por fim, este novo conceito também pode ser usado para a otimização de outros processos biotecnológicos, pois, como mencionado anteriormente, numerosos processos metabólicos em microrganismos são controlados por *riboswitches*, como por exemplo, *riboswitch* que responde ao SAM (S-adenosilmetionina) e participa do metabolismo de aminoácidos e sulfa. Assim como, existe *riboswitch* que responde e age diretamente no metabolismo de lisina. (MANDAL et al., 2003).

3 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo criar um novo modelo de controle do metabolismo celular microbiano, que seja amplamente aplicável e se constitua em um elemento inovador no portfólio da biologia sintética. Um sistema de pequenos RNAs não codificadores (sRNAs) foi desenvolvido com a finalidade de interferir na atuação dos *riboswitches*, os dispositivos responsáveis pela rede de regulação do metabolismo de purina. Os alvos foram os *riboswitches* que controlam a expressão dos genes *pbuE* e *nupG*, operons *pur* e *xpt-pbuX* (*riboswitches* de guanina e adenina), assim como o *riboswitch ribDG* que regula o operon para produção da riboflavina em *B. subtilis*.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um método de expressão gênica *in vitro*;
- Clonar e caracterizar *in vitro* os *riboswitches*;
- Desenhar sRNAs contra os *riboswitches* (*purE*, *xpt*, *nupG*, *pbuE* e *ribDG*) utilizando ferramentas *in silico*;
- Simular *in silico* a interação entre os sRNAs sintéticos e os *riboswitches*;
- Transcrever *in vitro* e avaliar a funcionalidade dos sRNAs sintéticos;
- Integrar os *riboswitches* e sRNAs no cromossomo de *B. subtilis*;
- Avaliar a estabilidade e funcionalidade *in vivo* dos *riboswitches* e sRNAs nas linhagens de *B. subtilis*;
- Produzir purinas nas linhagens reprogramadas e quantificá-las por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada com detector de arranjos de diodo (DAD);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização dos *riboswitches* de purinas e FMN

4.1.1 Desenvolvimento de método para expressão gênica *in vitro*

No intuito de padronizar a caracterização dos *riboswitches* e consequentemente dos sRNAs projetados, foi proposto neste estudo um novo método para determinação da expressão gênica *in vitro*, apresentando um amplo leque de possibilidades para caracterização *in vitro* de genes.

Inicialmente, o método foi testado para caracterizar os *riboswitches*, portanto foi decidido utilizar apenas o que regula o operon *pur* (nomeado *riboswitch purE*) na presença e ausência dos ligantes de purina para padronizar os experimentos posteriores. O *riboswitch* foi clonado em plasmídeo replicativo pPrib-luc (PEDROLLI et al., 2015) conforme está descrito no item 4.1.2 e assim submetido à experimentos de expressão gênica *in vitro*

O kit comercial *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega) foi utilizado seguindo instruções do fabricante e contém todos os componentes necessários para produção da luciferase, como fatores de transcrição/tradução e RNA polimerase. A concentração dos metabólitos guanina e adenina (50, 100 e 250 μM) foi testada para avaliar a especificidade do *riboswitch* com o ligante e utilizou-se o tampão Tris-HCl 20mM (pH 8,0) como controle negativo o qual foi utilizado nas preparações das soluções dos ligantes. A temperatura das reações foi de 30 e 37°C e tempo de incubação de 15-20 minutos.

As condições da reação foram: 1 μL de mix de aminoácidos 0,25mM, 4 μL do reagente S30, 3 μL do reagente T7, 1 μL de ligante (G ou A) e 1 μL do plasmídeo (50 ng/ μL). Após incubação, a reação foi interrompida adicionando 90 μL de BSA 1% (*bovine serum albumine*). Para determinação da atividade luciferase, alíquotas de 10 μL foram colocadas em microplaca cor branca com fundo reto e adicionado 50 μL de mix contendo substrato luciferina e ATP do kit *Luciferase Assay System* (Promega). Imediatamente, leituras da luminescência foram medidas no leitor de microplaca Infinite M200 (Tecan). Análise de variância (ANOVA) e teste Tukey foram realizados no software Minitab (versão 18) para comparar as médias e observar a significância dos resultados.

4.1.2 Clonagem dos *riboswitches* em plasmídeos replicativos

Os *riboswitches* foram amplificados pela técnica de PCR utilizando a enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polimerase* (Invitrogen) e o DNA genômico de *B. subtilis* Marburg 168. A reação constituiu de água ultrapura para 50 μ L, tampão 5x Phusion HF 10 μ L, 10 mM dNTPs 1 μ L, 10 μ M oligo *forward* 2,5 μ L, 10 μ M oligo *reverse* 2,5 μ L, DNA genômico do *B. subtilis* Marburg 168 (200ng), Phusion DNA polimerase (2U/ μ L) 0,5 μ L. No termociclador, as condições foram desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, desnaturação 98°C por 10 seg, anelamento 55°C por 30 seg, extensão 72°C por 30 seg/1 kb (30 ciclos) e extensão final 72°C por 10 min. Os oligos utilizados para amplificação foram desenhados contendo o sítio de ligação das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (FastDigest Thermo) assim como aproximadamente 20 nucleotídeos complementares às sequências 5' e 3' de cada *riboswitch*. A qualidade dos DNAs amplificados foi observada após preparação de gel de agarose a 1,0% que foi submetido à eletroforese com condições de 90 volts por 40 minutos. As bandas após corrida eletroforética foram visualizadas utilizando o transiluminador da Biorad seguindo o protocolo de uso do equipamento.

Os *riboswitches* foram clonados *upstream* ao gene repórter luciferase de vagalume *luc* no plasmídeo pPrib.*luc* contendo o promotor *ribB* de *E. coli* o qual participa do metabolismo de riboflavina no *B. subtilis* (Figura 5). O plasmídeo pPrib-*luc* e os *riboswitches* amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI, ambas FastDigest da ThermoFisher. As condições utilizadas foram tampão 10x FastDigest 6 μ L, água ultrapura para 60 μ L, DNA 2000 ng, 2 μ L de cada enzima (1 μ L da enzima para até 1000ng de DNA plasmidial). O plasmídeo foi desfosforilado utilizando a enzima CIP (10.000U/mL NEB), a qual foi adicionada em simultâneo num volume de 2 μ L na reação. A incubação foi a 37°C por uma hora e realizada a inativação a 80°C por 20 minutos.

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*.



Fonte: o autor.

A enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs - NEB) foi utilizada para ligação das partes e a proporção molar de vetor:inserto foi de 1:3. A reação se constituiu de tampão 10x T4 DNA ligase 2 µL, vetor 100 ng, inserto 3x mais que o vetor, água ultrapura para 20 µL e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (400.000U/µL). Os cálculos foram realizados no software online *Ligation Calculator*. As amostras foram incubadas a 22°C por uma hora e a enzima inativada a 65°C por 15 min.

As células quimicamente competentes utilizadas para transformação foram preparadas a partir de uma pré-cultura de *E. coli* TOP10 previamente crescida em LB líquido por 24 horas a 37°C e agitação de 220 rpm. A pré-cultura com OD600 de 0,03 foi inoculada em 100 mL de meio LB e incubada a 37°C, sob agitação de 220 rpm até atingir OD600 de 0,4. As células foram transferidas para tubos cônicos de 50mL previamente resfriados em gelo e centrifugadas por 10 minutos a 5.000 xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 20 mL de CaCl₂ 0,1M previamente resfriado. As amostras foram mantidas no gelo por 20 min e centrifugadas por 10 min a 5.000 xg e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* se adicionou 2 mL de CaCl₂ 0,1M com glicerina 10%. As células quimicamente competentes foram distribuídas em microtubos e estocadas em freezer -80°C.

Para a transformação, adicionou-se 10 µL da reação de ligação a 50 µL de *E. coli* TOP10 quimicamente competente. As amostras foram mantidas no gelo por 30 min, banho-maria a 42°C por 30 seg e gelo por 2 min para choque térmico. Aliquotas de 250 µL de meio SOC líquido (extrato de levedura 5 g/L; cloreto de sódio 0,5 g/L; triptona 20 g/L; cloreto de potássio 0,186 g/L; sulfato de magnésio 2,4 g/L; glicose 20mM; pH 7,0-7,2) foram adicionadas às amostras e incubadas a 37°C por uma hora a 220 rpm. Após incubação, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; ágar 16g/L; pH 7,0-7,2) suplementado com ampicilina com concentração final de 100 µg/mL. As placas foram cultivadas a 37°C por 24 horas em estufa microbiológica. As colônias crescidas foram repassadas para meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas sob agitação de 220 rpm.

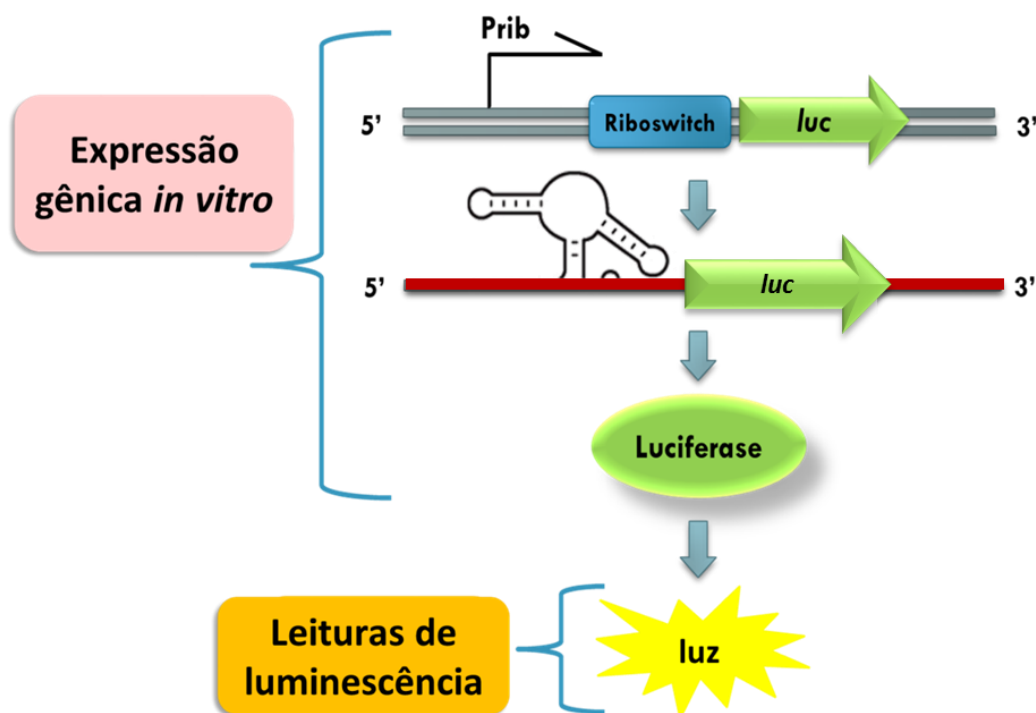
Os plasmídeos extraídos (*PureYield™ Plasmid Miniprep System* - Promega) das colônias crescidas foram submetidos ao sequenciamento para confirmação da clonagem. A reação de PCR para sequenciamento continha *Big Dye Mix* 1 µL, 5X tampão de sequenciamento 3,5 µL, 3,2 µM oligo *reverse* M13 2 µL, plasmídeo purificado 500 ng e água ultrapura para 20 µL. As condições do termociclador foram desnaturação inicial a 96°C por 1 min, desnaturação 96°C por 10 seg, anelamento 50°C por 5 seg e extensão 60°C por 5 min. As amostras amplificadas foram purificadas com o *BigDye Xterminator Purification Kit*

(Applied Biosystems) seguindo as condições fornecidas pelo fabricante. O método de sequenciamento foi o Sanger utilizando o equipamento 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas nos softwares *Sequence Scanner* v 2.0 (Applied Biosystems) e *Serial Clonner* v 2.6.1 (Serial Basics).

4.1.3 Expressão gênica *in vitro* dos *riboswitches*

A caracterização dos *riboswitches* foi realizada para avaliar seu potencial regulatório sobre a expressão do gene *luc*. Reações de transcrição e tradução *in vitro* foram realizadas com cada plasmídeo contendo os *riboswitches* de purinas e *riboswitch* de flavina utilizando o kit *E. coli* T7 S30 *Extract System for Circular DNA* (Promega), com as seguintes condições: 1 µL de mix de aminoácidos 0,25 mM, 4 µL do reagente S30, 3 µL do reagente T7, 1 µL de ligante a 50 µM (G e A) e 100 µM de FMN e 1 µL do plasmídeo (50 ng/µL). Após incubação a 30°C por 20 min, a reação foi interrompida adicionando 90 µL de BSA 1% (*bovine serum albumine*). Para determinação da atividade luciferase, alíquotas de 10 µL foram colocadas em microplaca e adicionado 50 µL de mix contendo substrato luciferina e ATP do kit *Luciferase Assay System* (Promega). Imediatamente, leituras da luminescência foram medidas no leitor de microplaca Infinite M200 (Tecan) (Figura 6). Cada *riboswitch* de purina foi submetido a três tratamentos em triplicata: apenas tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,0) como controle negativo, apenas guanina (50 µM) e apenas adenina (50 µM). O *riboswitch* de FMN foi submetido a uma reação de controle com tampão e outra com apenas FMN (100µM). Análise de variância (ANOVA) e teste Tukey foram realizados no software Minitab (versão 18) para comparar as médias e observar a significância dos resultados.

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

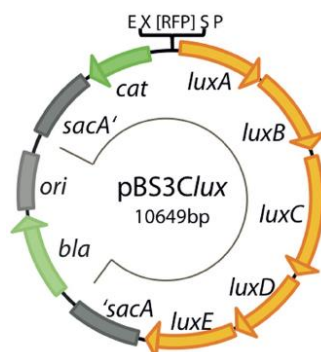


Fonte: o autor.

4.1.4 Integração dos *riboswitches* no cromossomo de *Bacillus subtilis*

A estabilidade e funcionalidade *in vivo* dos *riboswitches* em células de *B. subtilis* foram avaliadas após clonagem no plasmídeo integrativo pBS3Clux (RADECK et al., 2013) que contém o *biobrick prefix* (BBp – contendo os sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI*) e *biobrick suffix* (BBs – com os sítios *SpeI* e *PstI*), além do operon *luxABCDE*, para a bioluminescência. Este plasmídeo é capaz de se integrar no locus *sacA* do *B. subtilis* e possui os genes *cat* para resistência ao cloranfenicol, o gene que codifica a proteína fluorescente vermelha RFP e *bla* (resistência a ampicilina) (Figura 7).

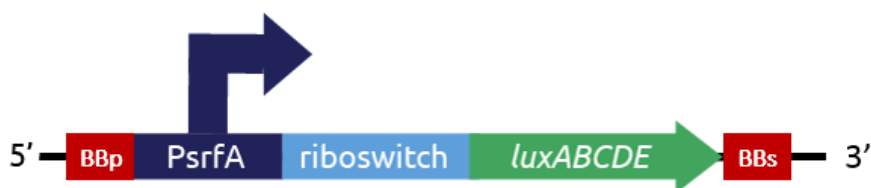
Figura 7- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem dos *riboswitches* de purina e FMN contendo os sítios de restrição padrão *Biobrick* (E: *EcoRI*, X: *XbaI*, S: *SpeI* e P: *PstI*), o cassete do gene *rfp* e de resistência para cloranfenicol *cat*, operon *luxABCDE* como repórter e integra em *Bacillus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



Fonte: Radeck et al. (2013).

Os *riboswitches* foram clonados *downstream* ao promotor *Psrfa* ou *Pveg* (promotores constitutivos e fortes de *B. subtilis*), e estas partes genéticas foram inseridas entre o BBp e BBs para avaliar a expressão do operon *lux* (Figura 8). Os plasmídeos *pBS3Clux_Promotor-riboswitch* foram clonados em *E. coli* apenas para replicação conforme metodologia descrita no item 4.1.2. Os promotores utilizados foram *Psrfa* e *Pveg* e apresentam características semelhantes em relação à força. Após obtenção dos plasmídeos, foram integrados no cromossomo de *B. subtilis* Marburg 168 por recombinação homóloga no locus *sacA*.

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 *Psrfa* ou *Pveg* 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.



Fonte: o autor.

As células competentes de *B. subtilis* Marburg 168 foram obtidas cultivando-as em meio LB overnight 37 °C. Após crescimento, a OD 600nm da cultura foi padronizada em 0,5, inoculada em 20 mL de meio SpC [(NH₄)₂SO₄ 2 g/L; K₂HPO₄ 18,3 g/L; KH₂PO₄ 6 g/L; citrato trissódico x 2H₂O 1 g/L; 50% glicose 0,2 mL; 1,2% MgSO₄ 0,3 mL; 10% extrato de levedura 0,4 mL; 1% casaminoácidos 0,5 mL; triptofano 20 µg/mL] e incubada a 37 °C

com aeração. No final da fase exponencial, 2 mL da cultura foram inoculados em 200 ml de meio SpII [(NH₄)₂SO₄ 2 g/L; K₂HPO₄·3H₂O 18,3 g/L; KH₂PO₄ 6 g/L; citrato trissódico x 2H₂O 1 g/L; 50% glicose 2 mL; 1,2% MgSO₄·3H₂O 14 mL; 10% extrato de levedura 2 mL; 1% casaminoácidos 2 mL; 0,1 M CaCl₂ 1 mL; triptofano 20 µg/mL] e incubados com baixa aeração por 90 min. A cultura foi centrifugada 4000 xg por 10 min temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 16,5 mL do próprio sobrenadante e adicionado 3,5 mL de glicerol 60% estéril. Aliquotas da célula competente foram realizadas e armazenadas em freezer -80 °C.

Para integração no cromossomo, os plasmídeos (1500 ng) foram adicionados a 250 µL das células competentes de *B. subtilis* 168 e 250 µL do meio SpII+EGTA (mesma composição do meio SpII sem CaCl₂ e adição de 4 mL EGTA a 0,1 M, pH 8,0) e incubados a 37°C por 1 hora e 30 min a 220 rpm. Foi adicionado o antibiótico cloranfenicol (1 µg/mL) e deixado na incubação por mais 1 hora e 30 min, nas mesmas condições de agitação e temperatura. As amostras (150 µL) foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com cloranfenicol com concentração final de 5 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa microbiológica. As colônias crescidas foram repassadas para LB líquido e cloranfenicol (5 µg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas sob agitação de 220 rpm.

DNAs genômicos das linhagens de *Bacillus* foram extraídos utilizando o kit comercial *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher) e incubação com lisozima (10mg/mL) por 1 hora a 37°C. PCRs foram realizadas com a enzima TAQ DNA polimerase para confirmar a integração das partes no cromossomo. As condições da PCR foram 10x TAQ Buffer 2,5 µL, 10mM dNTPs 0,5 µL, 10 µM oligo *forward* 2 µL, 10 µM oligo *reverse* 2 µL, 25 mM MgCl₂ 3 µL, DNA 200ng, TAQ DNA polimerase (5 U/µL) 0,2 µL, água ultrapura para 25 µL. No termociclador: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, desnaturação 95°C por 30 s, anelamento 55°C por 30 s, extensão 72°C 1 min/kb (30 ciclos) e extensão final 72°C por 10 min. Os oligos utilizados para amplificação foram desenhados para anelar apenas com a sequência do plasmídeo integrada.

4.1.5 Funcionalidade e caracterização *in vivo* das linhagens de *B. subtilis*

As linhagens de *B. subtilis* contendo as construções com os pBS3Clux_*Promotor-riboswitches* foram submetidas a ensaios de funcionalidade *in vivo*. As linhagens foram cultivadas em meio LB líquido para obtenção da curva de crescimento e medições de

bioluminescência. O microcultivo das linhagens de *B. subtilis* foi realizado no leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan), realizando-se leituras de OD a 600nm para obtenção de curva de crescimento e bioluminescência com tempo de integração 1000 ms. O volume de cultura em cada poço foi 200 μ L e OD inicial entre 0,016 e 0,02. As medições foram realizadas a cada 10 min de cultivo com agitação orbital de 150 rpm e utilização da microplaca *white* μ CLEAR (Greiner) com 96 poços e fundo reto.

Para avaliar a regulação dos *riboswitches* no operon da bioluminescência, foram realizados três tratamentos em triplicata: crescimento das linhagens de *B. subtilis* na presença de 50 μ M guanina (G), presença de 50 μ M adenina (A) e o controle negativo sendo apenas o LB. *B. subtilis* Marburg 168 e LB sem cultura foram utilizados como controles negativos. Os testes foram realizados três vezes nas mesmas condições para obtenção de médias e desvios padrão.

4.2 Caracterização dos pequenos RNAs sintéticos

4.2.1 Design e avaliação *in silico* dos sRNAs

Sequências de sRNAs foram desenhadas para cada um dos seis *riboswitches* utilizando o software RiboMaker (RODRIGO; JARAMILLO, 2014; ROSTAIN et al., 2014), ferramenta de desenho de RNAs reguladores que adapta técnicas de deslocamento de fita derivadas da nanotecnologia combinadas com computação evolutiva. Neste modelo de interação, o início do pareamento intermolecular é dirigido por uma pequena sequência base (*seed site*) que ancora um RNA ao outro e desencadeia uma rápida reação de pareamento, até que a hibridização completa entre as duas moléculas termine. Para os propósitos deste projeto, foi utilizado o modo restrito (*constrained design*), pois permitiu que a sequência de uma das espécies fosse inteiramente definida (sequência dos *riboswitches*) e o sistema ficou livre para evoluir a outra sequência de RNA em direção à regulação desejada.

Como exemplo, foi desenhada uma sequência consenso dos *riboswitches* de purina e gerado um sRNA através do Ribomaker que, apesar de se enovelar, possui uma sequência não-pareada projetada para funcionar como base para o início do pareamento com o alvo *riboswitch* (Figura 9).

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.

5'-UTR CONSENSUS

CACUCAUAUAAUCGCGNGAAUAUGGCNCGCAAGUUUCUACCNGGCAACCGUAA
AUUGCCNGACUACANANA

sRNA

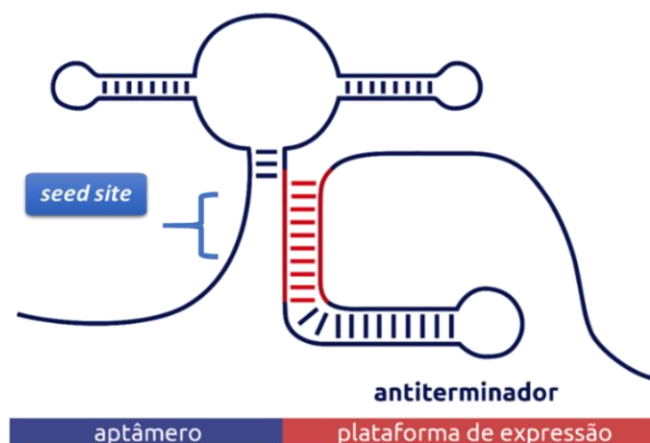
AUACCUUAGGAAGAGGAAUAUGGCGCUGAACGUGCUAUAUGAGUUGAGAUcaaa
gcccgcgaaaggcgggcuuuucugu
...((((.....)))).....((((.....)))).....((.....((((.....)))))).....)..

Fonte: o autor.

O software NUPACK (ZADEH et al., 2010) foi utilizado para avaliar computacionalmente as propriedades termodinâmicas das sequências dos sRNAs em conjunto com os *riboswitches* numa solução com concentração determinada, prevendo a estrutura secundária formada pelo sistema *riboswitch*-sRNA.

Os sRNAs foram desenhados para parear com os *riboswitches* na sequência (*seed site*) representada na figura 10, no início da sequência do aptâmero para desestruturá-lo e evitar o pareamento com os ligantes.

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.



Fonte: o autor.

Os sRNAs foram comprados como duas sequências complementares de oligonucleotídeos de DNA, as quais foram aneladas em tampão TE a 98°C por 10 minutos e quantificadas em *Nanodrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo). Todas as sequências dos sRNAs se iniciam com o promotor T7 e terminam com o terminador T500. Cada sRNA foi transcrito utilizando o kit *RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems – SP6 and T7* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas a 37°C por 18 horas e tratadas com DNase (1U/μg de DNA) por 30 min a 37°C. A purificação do RNA foi realizada utilizando o kit da *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) e as amostras foram estocadas em freezer -20°C. Após a transcrição dos sRNAs, a funcionalidade dos mesmos foi testada *in vitro*.

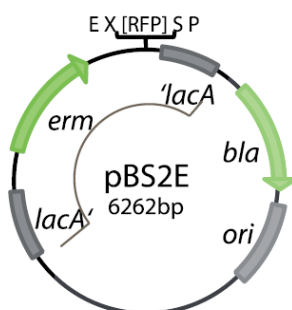
4.2.2 Expressão gênica *in vitro* dos sistemas *riboswitch*-sRNA

Os sRNAs foram testados visando a interrupção da regulação do gene *luc* pelos *riboswitches*. As reações de transcrição e tradução *in vitro* foram realizadas com cada plasmídeo contendo o *riboswitch* e com o sRNA previamente transcrito utilizando o kit *E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNA* (Promega), com as seguintes condições: 1 μL de mix de aminoácidos 0,25mM, 4 μL do reagente S30, 3 μL do reagente T7, 1 μL do ligante a 50 μM (G e A) e 100 μM de FMN, 1 μL do plasmídeo contendo o *riboswitch* (50 ng/μL) e 1 μL do sRNA transcrito (300 ng/μL). Após incubação a 30°C por 20 min, a reação foi interrompida adicionando 90 μL de BSA 1%. Para determinação da atividade luciferase, alíquotas de 10 μL foram colocadas em microplaca e adicionado mix 50 μL de substrato luciferina e ATP do kit *Luciferase Assay System* (Promega). Imediatamente, leituras da luminescência foram medidas no leitor de microplaca Infinite M200 (Tecan). Foram realizados três tratamentos em triplicata: apenas tampão (Tris-HCl 20mM pH 8,0) como controle negativo, apenas guanina (50 μM) e apenas adenina (50 μM). O sRNA desenhado para o *riboswitch* de FMN foi submetido a uma reação de controle com tampão e outra reação com apenas FMN (100μM). Pequenos RNAs não-específicos de mesmo tamanho que os específicos foram submetidos aos mesmos tratamentos e utilizados como controle negativo. Análise de variância (ANOVA) e teste Tukey foram realizados no software Minitab (versão 18), para comparar as médias e observar a significância dos resultados.

4.2.3 Integração dos sRNAs no cromossomo de *B. subtilis*

A estabilidade e funcionalidade *in vivo* dos sRNAs em células de *B. subtilis* foram avaliadas clonando-os em plasmídeo integrativo pBS2E (RADECK et al., 2013) que contém o BBp e BBs. Este plasmídeo se integra no locus *lacA* de *B. subtilis* e possui o gene *erm* de resistência à eritromicina, o gene que codifica a proteína fluorescente vermelha RFP e de resistência a ampicilina (*bla*) para clonagens em *E. coli* (Figura 11).

Figura 11- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem dos sRNAs sintéticos contendo os sítios de restrição padrão *Biobrick* (E: *EcoRI*, X: *XbaI*, S: *SpeI* e P: *PstI*), o cassete do gene *rfp* e de resistência para eritromicina *erm* e integra em *Bacillus subtilis* no locus *lacA*.



Fonte: Radeck et al. (2013).

O sistema com os sRNAs sintéticos foi planejado com a unidade de transcrição contendo cada sRNA sob controle do promotor *grac* induzível por IPTG e clonados com o padrão BBp e BBs no plasmídeo pBS2E, descrito anteriormente (Figura 12). O nosso grupo de pesquisa observou (dados não publicados) que este promotor respondia à transcrição positivamente sem a adição de IPTG, sendo interessante o seu uso. Portanto, os plasmídeos não continham o gene *lacI*, sendo o promotor utilizado como constitutivo.

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.



Fonte: o autor.

As condições de preparação das células competentes de *B. subtilis* Marburg 168, assim como a transformação e integração no cromossomo, foram descritas anteriormente de acordo com o item 4.1.4.

4.2.4 Funcionalidade do sistema em *B. subtilis* reprogramado com os sRNAs

As linhagens contendo as duas unidades de transcrição pBS3Clux_Promotor-*riboswitches* e *Pgrac_sRNA* em *locus* distintos também foram submetidas a ensaios de funcionalidade *in vivo*. As linhagens foram cultivadas em meio LB para obtenção da curva de crescimento e medições de bioluminescência. O cultivo dos *Bacillus* foi realizado no leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan), realizando-se leituras de OD a 600nm, para obtenção de curva de crescimento, e bioluminescência com tempo de integração 1000 ms. O volume de cultura em cada poço foi 200 μ L e OD inicial entre 0,016 e 0,02. As medições foram realizadas a cada 10 min de cultivo com agitação orbital de 180 rpm e a microplaca utilizada foi a *white* μ CLEAR (Greiner) com 96 poços e fundo reto. Caso estes fossem funcionais, a ação dos *riboswitches* seria bloqueada e seria observado através do monitoramento da atividade luciferase. Os controles negativos foram *B. subtilis::riboswitch/luxABCDE::2E* (sem o sRNA).

Para avaliar o *riboswitch ribDG*, foi construída uma linhagem *B. subtilis::sRNA(ribDG)* contendo apenas o sRNA. A ação deste sRNA foi avaliada diretamente sobre a produção de riboflavina da linhagem reprogramada. Curva de crescimento (OD 600nm) e leituras de fluorescência no leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan) foram realizadas. As condições para medição da fluorescência foram comprimento de onda de emissão 525 nm e 450 nm de excitação com ganho de 70. O volume de cultura em cada poço foi 200 μ L e OD inicial entre 0,016 e 0,020. As leituras foram realizadas a cada 10 min de cultivo com agitação orbital de 180 rpm e a microplaca utilizada foi a *black* μ CLEAR (Greiner) com 96 poços e fundo reto. Curva padrão a partir de concentrações da riboflavina comercial foi realizada para estimar a concentração produzida pela linhagem reprogramada.

Todos os resultados apresentados para este e todos os outros experimentos representam a média aritmética de pelo menos três repetições, sendo que as barras de erro mostradas nos gráficos indicam o desvio padrão relativo à média.

4.3 Confirmação de um modelo de reprogramação do metabolismo de purinas

4.3.1 Avaliação da transcrição e estabilidade dos sRNAs na célula

Foi utilizada a sequência do RNA-Broccoli (FILONOV et al., 2014) para avaliar a estabilidade dos sRNAs no *B. subtilis* e confirmar se estão sendo transcritos na célula. O RNA-Broccoli enovela-se em um aptâmero capaz de ligar 3,5-difluoro-4-hidroxibenzilideno imidazolinona (DFHBI), uma molécula não fluorescente quando isolada, gerando um complexo que emite fluorescência imitando a proteína verde fluorescente (GFP).

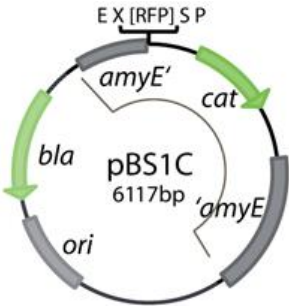
A sequência correspondente ao RNA-Broccoli (Tabela 1) foi adicionada à extremidade 3'- do sRNA, entre este último e a sequência do terminador T500. Estes sistemas foram clonados no plasmídeo pBS1C que possui todas as características dos outros plasmídeos descritos por Radeck et al. (2013): não possui gene repórter, integra no locus *amyE* e possui cassete de resistência para cloranfenicol *cat*. O promotor induzível por IPTG *grac* foi utilizado para controlar a transcrição do sRNA-RNA-Broccoli (Figura 13).

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

	Sequência 5´-3´
RNA-Broccoli	sRNA- UUGCCAUGUGUAUGUGGGAGACGGUUCCAGAUAUUCGUAUCUGUCGAGUA GAGUGUGGGCUCCACAUACUCUGAUGAUCCUUCGGGAUCAUUCAUGGCA A-terminador

Fonte: adaptado de Filonov et al. (2014).

Figura 13- Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem do sistema sRNA-RNA-Broccoli contendo os sítios de restrição padrão *Biobrick* (E: *EcoRI*, X: *XbaI*, S: *SpeI* e P: *PstI*), o cassete do gene *rfp* e de resistência para cloranfenicol *cat* e integra em *Bacillus subtilis* no locus *amyE*.



Fonte: Radeck et al. (2013).

O cultivo das linhagens de *B. subtilis* com os sistemas sRNAs-RNA-Broccoli foi realizado no meio definido [KH_2PO_4 0,4%; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ 1,6%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,3%; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,0002 %; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0123%; ZnCl_2 0,00017%; triptofano 50 $\mu\text{g/mL}$; citrato de ferro e amônio 22 $\mu\text{g/mL}$; glicose 0,5%]. O leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan) foi utilizado para as leituras de OD 600nm visando obter a curva de crescimento e fluorescência. As condições para medição da fluorescência foram comprimento de onda emissão 507 nm e 472 nm de excitação com ganho de 85. O volume de cultura em cada poço foi 200 μL e OD inicial entre 0,016 e 0,02. As leituras foram realizadas a cada 10 min de cultivo com agitação orbital de 180 rpm e a microplaca utilizada foi a *black* μCLEAR (Greiner) com 96 poços e fundo reto.

4.3.2 Sequência estabilizadora RiboJ fusionada ao sRNA

A RiboJ e suas variações (chamadas “isolantes”) são sequências de RNA que possuem estrutura secundária complexa e se encontram, naturalmente, na região 5' UTR (não traduzida) de algum mRNA e tem por função aumentar o tempo de vida do RNA na célula, constituindo-se em uma ferramenta naturalmente utilizada por bactérias e outros microrganismos (LOU et al., 2012; NIELSEN et al., 2016).

A sequência sintética RiboJ-sRNA, contendo o BBp e BBs para clonagem, foi adquirida como dois oligos de DNA fita simples (um *forward* e outro *reverse*) com 20 nucleotídeos complementares. Foi realizada PCR para preenchimento das partes com a Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Invitrogen). A reação constituiu de água ultrapura para 50 μL , tampão 5X Phusion HF 10 μL , 10 mM dNTPs 1 μL , 2000ng oligo *forward* ~5,8 μL , 2000ng oligo *reverse* ~6,0 μL , Phusion DNA polimerase (2U/ μL) 0,5 μL . No termociclador, as condições foram desnaturação inicial a 98°C por 30 seg, desnaturação 98°C por 10 seg, anelamento 50°C por 30 seg, extensão 72°C por 30 seg (30 ciclos) e extensão final 72°C por 10 min. A qualidade do fragmento preenchido foi observada após preparação de gel de agarose a 1,0% que foi submetido à eletroforese com condições de 90 volts por 40 minutos. As bandas após corrida eletroforética foram visualizadas utilizando o transiluminador da Biorad seguindo o protocolo de uso do equipamento.

A clonagem da RiboJ-sRNA foi realizada semelhantemente aos sRNAs sintéticos, no plasmídeo pBS2E *downstream* ao promotor *grac* (item 4.2.3). A linhagem de *Bacillus* reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA foi cultivada em meio LB para obtenção da curva de crescimento e medições de bioluminescência. O cultivo foi realizado no leitor de

microplacas Infinite M200 (Tecan), realizando-se leituras de OD a 600nm, para obtenção de curva de crescimento, e bioluminescência. A descrição mais detalhada do experimento está descrita no item 4.2.4.

4.3.3 Scale-up de *B. subtilis* reprogramados com sRNA e RiboJ-sRNA

Para confirmação da funcionalidade do sistema contendo a sequência insuladora, foi decido aumentar a escala do cultivo pensando futuramente em trabalhar com biorreator para produção de metabólitos a partir do aumento de purinas intracelular.

Pré-culturas crescidas em meio LB, *overnight*, foram realizadas com *B. subtilis* controle sem o sRNA e *B. subtilis* reprogramados com sRNA e RiboJ-sRNA. O cultivo foi realizado adicionando-se a pré-cultura, com densidade óptica inicial (600nm) padronizada em 0,1, em frascos erlenmeyers de 1000mL com 100mL de meio LB. O shaker utilizado foi padronizado com agitação de 220 rpm e temperatura de 37°C. O crescimento foi avaliado por aproximadamente 10 horas e amostras de células foram coletadas para medição da absorbância a 600nm e preparação de curva de crescimento. Alíquotas de 200 µL também foram retiradas durante o crescimento para medição da bioluminescência no leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan) nas mesmas condições do microcultivo. Os cultivos foram realizados em triplicata por três vezes e as médias e desvios padrão foram calculados para apresentação dos resultados.

4.3.4 Quantificação de guanina e adenina produzidas pelas linhagens de *B. subtilis* reprogramadas

Para confirmar as propriedades regulatórias do sRNAs sintéticos sobre o metabolismo de purinas, análises em HPLC foram realizadas para quantificar o aumento da produção de purinas pelas bactérias reprogramadas que transcrevem os sRNAs, sem o operon *lux* como repórter.

Coletas de células, após cultivo em LB adicionado de sacarose 2,0%, foram realizadas para quantificar guanina e adenina da linhagem controle sem o sRNA, de *B. subtilis* reprogramado com o sRNA e *B. subtilis* reprogramado com o sistema RiboJ-sRNA. Curvas de crescimento medindo-se absorbância (600nm) foram realizadas para ajustar a concentração de células para as análises de quantificação. A lise das células foi obtida após tratamento com a enzima lisozima (10 mg/mL em tampão PBS 0,1M) por 1 hora a 37°C em banho-maria. Aos

lisados, TCA 1,0% foi adicionado para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas a 17000 xg por 30min, e assim, o sobrenadante foi filtrado com membrana 0,22µm.

Soluções padrão de guanina e adenina foram preparadas em concentrações variadas de 0,03, 0,05, 0,10, 0,21, 0,41, 0,83, 1,65 e 3,31 mM de guanina com pureza padrão HPLC (Sigma) e 0,03, 0,06, 0,12, 0,23, 0,46, 0,93, 1,85, 3,70 mM de adenina padrão HPLC (Sigma) em 2 M de HClO₄ e realizadas curvas-padrão para calcular a produção das purinas pelas bactérias reprogramadas (REYNAL; BRODERICK, 2009).

O sistema de HPLC utilizado foi da classe Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments) consistindo de bomba modelo LC-20AD, controlador de sistema CBM-20A, detector fotodiodo SPD-M20A e coluna C18 ODS Hypersil de 250x4,0mm com tamanho de partícula 5µm (Thermo Scientific) em forno isotérmico a 30°C. Para detecção das purinas, a absorbância foi monitorada em 254 nm pelo detector de fotodiodo. Uma alíquota de 20 µL de padrão ou amostra foi injetada na coluna e a separação realizada usando fluxo contínuo de 1,0 mL/min e gradiente com duas fases móveis.

Os solventes utilizados na fase móvel foram KH₂PO₄ 0,3 M (solvente A) e o solvente B foi 80% (vol/vol) KH₂PO₄ 0,3 M adicionado de 20% (vol/vol) acetonitrila. Ambos os solventes foram ajustados para pH 4,0, filtrados com microfiltro 0,45 µm e desgaseificados usando ultrassom por 10 minutos. A eluição da amostra pela coluna foi realizada usando gradiente: 100% o solvente A (0% de solvente B) foi utilizado durante os primeiros 7 min; o solvente B foi aumentado de 0 para 50% de 7 para 20 min. Após cada ciclo e antes de injetar a próxima amostra, a coluna foi reequilibrada para as condições de partida.

5 RESULTADOS

5.1 Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados para desenvolvimento do trabalho

Na tabela 2, a seguir, estão descritos os oligos sintetizados e utilizados neste estudo para a amplificação da sequência dos *riboswitches* com sítios de enzimas de restrição, oligos para sequenciamento e confirmação das clonagens, sequências sintéticas dos sRNAs com o promotor para clonagem em plasmídeos replicativos e oligos para clonagem *in vitro* e *in vivo*

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

Nomenclatura	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Finalidade
M13.seq-fw	TGTAAAACGACGGCCAGT	52.6	Sequencia- mento de plasmídeos
M13.seq-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	49.8	
pBS1C.seq_fw	AAAGGTCATTGTTGACGCGG	55.4	
pBS1C.seq_rv (usado como fw para pBS3Clux)	GAGCGTAGCGAAAAATCC	52.6	
pBS3Clux.seq_rv	GAAATGATGCTCCAGTAACC	53.4	
pBS2E.seq_fw	AGCTCCCCGGGACGTTCTTGCCATTGC	67.2	
pBS2E.seq.new (rv)	AGCTGGCTCAACTCCAAATATAGC	62.2	
BioBrick- suffix_fw	TACTAGTAGCGGCCGCTGCAG	61.5	Inserção do BBp e BBs
BioBrick- prefix_rv	CTCTAGAAGCGGCCGCGAATTC	61.4	
Pveg(BBp)_fw	ATCAGAATTTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAGTTCTGAGAATTGGTATGCC	70.0	Sequência de promotores
Pveg(BBs)_rv	TCGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAACTACATTTATTGTACAACACGAGC	69.6	
Pgrac(BBp)_fw	GCTAGAATTTCGCGGCCGCTTCTAGAAATTGGGAATTGTTATCCGCTCAC	69.8	
Pgrac(BBs)_rv	TCGTCTGCAGCGGCCGCTACTAGTAGGTACCAGCTATTGTAACATAATC	69.8	
srfA(BBp)_fw	GCTAGAATTTCGCGGCCGCTTCTAGGATTGAACGCAGCAGTTTGG	70.9	
srfA(SpeI)_rv	TCGAAGTAGTTTATCCATATCAGCTTTTAATTCTTATG	58.6	
purE(HindIII)_fw	GCTAAAGCTTGAAATCAAAACACGACCTCATATAATC	60.8	Clonagem para análises <i>in vitro</i>
purE(BamHI)_rv	TCGAGGATCCATTCTACTAGCGGCTGC	65.5	
xpt(HindIII)_fw	GCTAAAGCTTAGGAACACTCATATAATCGCGTG	62.1	
xpt(BamHI)_rv	TCGTGGATCCTGCTTCCATCCTGTCTAC	64.0	
pbuE(HindIII)_fw	GCTAAAGCTTATTATCACTTGTATAACCTCAATAATATG	58.6	

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

Nomenclatura	Sequência (5'-3')	T _m (°C)	Finalidade
pbuE(BamHI)_rv	TCGAGGATCCAACAAACTCCTTTACTTAAATG	59.7	Clonagem para análises <i>in vitro</i>
nupG(HindIII)_fw	GCTAAAGCTTCATCTTAGAAAAAGACATTCTTG	58.4	
nupG(BamHI)_rv	TCGTGGATCCGATAGCAACTCCTATGAG	62.5	
pbuE(BBp)_fw	ATCGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAATTATCACTTGTATAACCTCAATAATATG	66.6	Clonagem para análises <i>in vivo</i>
pbuE(BBs)_rv	TCGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAAACAAACTCCTTTACTTTAAATG	67.6	
xpt(BBp)_fw	GCTAGAATTTCGCGGCCGCTTCTAGAAGGAACACTCATATAATCG	68.1	
xpt(BBs)_rv	TCGTCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATGCTTCCATCCTGTCTAC	71.2	
nupG(BBp)_fw	ATGCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGACATCTTAGAAAAAGACATTC	67.0	
nupG(BBs)_rv	TCGTCTGCAGCGGCCGCTACTAGTAGATAGCAACTCCTATGAG	70.2	
ribDG(BBp)_fw	TGCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGTTGTATCCTTCGGGGCAGGGTG	74.3°	
ribDG(BBs)_rv	ATCGCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATTTTTGTTATTTACCGTCAAAAAG	68.7°	
Promotor-purE (riboswitch)	GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGGAGTTCTGAGAATTGGTATGCC TTATAAGTCCAATTAACAGTTGAAAACCTGCATAGGAGAGCTATG CGGGTTTTTTTATTTTACATAATGATACATAATTTACCGAACTTG CGGAACATAATTGAGGAATCATAGAATTTTGTCAAAAATAATTTTA TTGACAACGTCTTATTAACGTTGATATAATTTAAATTTTATTTGA CAAAAATGGGCTCGTGTTGTACAATAAATGTAGTGCTAAAGCTTG AAATCAAAAACACGACCTCATATAATCTTGGGAATATGGCCCATAA GTTTCTACCCGGCAACCGTAAATTGCCGGACTATGCAGGAAAGTG ATCGATAAACTGACATGGATATATCGCAGAAGCGAACGACTGAC GATACATGTACCATGCCCGTTTGTATTGCTTCCTCATAAGTGCA ATGCAGAGCGGGTATTTTTTATTTTCTGAAAACAAAAGCATTAGA AGGTGGGGAACAGAGGATCCTCGATACTAGTAGCGGCCGCTGCAG	-	Sequência sintética do promotor e <i>riboswitch purE</i> com o BBp e BBs
T7-sRNA(purE) (EcoRI/HindIII)_fw	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGATTCAACAATTATGTGAGGTCGTGTTTCTCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTA	72.2	Avaliação dos sRNAs <i>in vitro</i>
T7-sRNA(purE) (EcoRI/HindIII)_rv	AGCTTACAGAAAAGCCCGCCTTTTCGGCGGGCTTTGAGAAACACGACCTCACATAATTGTTGAATCCCTATAGTGAGTCGTATTAG	73.2	
sRNA_purE_fw	GATTCAACAATTATGTGAGGTCGTGTTTCTCAAAGCCCGCCGAAAGCGGGCTTTTCTGT	71.4	
sRNA_purE_rv	ACAGAAAAGCCCGCCTTTTCGGCGGGCTTTGAGAAACACGACCTCACATAATTGTTGAATC	71.4	
sRNA_ribDG_fw	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTATCCTGGCTCCGAAGGGTGATATTACAAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGT	74.8	
sRNA_ribDG_rv	ACAGAAAAGCCCGCCTTTTCGGCGGGCTTTGTGAATATGCACCCTTCGGAGCCAGGATAGGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	74.8	
sRNA_xpt_fw	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGATTATGCGACATTCATCCGTGATCTCTGACAAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGT	72.8	
sRNA_xpt_rv	ACAGAAAAGCCCGCCTTTTCGGCGGGCTTTGTGAGAGATCAACGGATGAATGTCGCATAATCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	72.8	
sRNA_nupG_fw	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGATCATGTACGAGGATGGCTTGTTTTCTGACAAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGT	73.8	
sRNA_nupG_rv	ACAGAAAAGCCCGCCTTTTCGGCGGGCTTTGGTCAGAAAACAAGCCA TCCTCGTACATGATCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	73.8	

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

Nomenclatura	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Finalidade
sRNA_pbuE_fw	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCCATAGGTTATACAAGTGAT GAGAGACGCCCAAAGCCCGCCGAAAGCGGGCTTTTCTGT	73.8	Avaliação dos sRNAs <i>in vitro</i>
sRNA_pbuE_rv	ACAGAAAAGCCCGCCTTTCGGCGGGCTTTGGGCGTCTCTCATCAC TTGTATAACCTATGGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	73.8	

5.2 Plasmídeos e linhagens geradas neste estudo

Na tabela 3, estão descritos os plasmídeos utilizados e os que foram gerados neste estudo para a construção dos sistemas de *riboswitches* controlando o gene da luciferase de vagalume, como também o operon da bioluminescência. Do mesmo modo, os sistemas contendo os sRNAs foram clonados em plasmídeos replicativos para posteriormente integrá-los no genoma de *B. subtilis*.

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

Número	Linhagem hospedeira	Plasmídeo	Descrição	Resistência	Referência
1	<i>Escherichia coli</i> Top10	pPrib-luc(TKF)	promotor <i>rib</i> de <i>E. coli</i> controla o gene da luciferase de vagalume contendo RBS e ATG inicial para fusões transcricionais	AMP	PEDROLI et al. (2015)
2	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS1C	BGSC nº ECE257. Vetor vazio para integração no locus <i>amyE</i> de <i>B. subtilis</i>	AMP	RADECK et al. (2013)
3	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS3Clux	BGSC nº ECE261. Vetor para integração no locus <i>sacA</i> de <i>B. subtilis</i> contendo operon <i>luxABCDE</i> para bioluminescência	AMP	RADECK et al. (2013)
4	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E	BGSC nº ECE258. Vetor vazio para integração no locus <i>lacA</i> de <i>B. subtilis</i>	AMP	RADECK et al. (2013)
5	<i>E. coli</i> Top10	pBs3Clux_srfA	promotor <i>srfA</i> de <i>B. subtilis</i> controla a expressão do operon <i>luxABCDE</i>	AMP	Este estudo
6	<i>E. coli</i> Top10	pPrib-luc (GCA)_purE	promotor <i>rib</i> , <i>purE</i> <i>riboswitch</i> de <i>B. subtilis</i> em fusão traducional com luciferase de vagalume	AMP	Este estudo
7	<i>E. coli</i> Top10	pPrib-luc_RFNGsub	plasmídeo contendo o promotor <i>ribB</i> de <i>E. coli</i> e o gene da luciferase de vagalume controlado pelo <i>riboswitch</i> <i>ribDG</i> FMN de <i>B. subtilis</i> . Derivado de plasmídeo pT7luc(GCA)_RFNGsub	AMP	PEDROLI et al. (2015)

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

Número	Linhagem hospedeira	Plasmídeo	Descrição	Resistência	Referência
8	<i>E. coli</i> Top10	pPrib-luc(TKF)_xpt	promotor <i>rib</i> de <i>E. coli</i> , <i>xpt riboswitch</i> de <i>B. subtilis</i> em fusão transcricional com luciferase de vagalume	AMP	Este estudo
9	<i>E. coli</i> Top10	pPrib-luc(TKF)_pbuG	promotor <i>rib</i> de <i>E. coli</i> , <i>pbuG riboswitch</i> de <i>B. subtilis</i> em fusão transcricional com luciferase de vagalume	AMP	Este estudo
10	<i>E. coli</i> Top10	pPrib-luc(TKF)_nupG	promotor <i>rib</i> de <i>E. coli</i> , <i>nupG riboswitch</i> de <i>B. subtilis</i> em fusão transcricional com luciferase de vagalume	AMP	Este estudo
11	<i>E. coli</i> Top10	pPrib-(TKF)_pbuE	promotor <i>rib</i> de <i>E. coli</i> , <i>pbuE riboswitch</i> de <i>B. subtilis</i> em fusão transcricional com luciferase de vagalume	AMP	Este estudo
12	<i>E. coli</i> Top10	pBS1C_Pgrac/ RNA-Broccoli	Plasmídeo pBS1C com Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do RNA-Broccoli.	AMP	Este estudo
14	<i>E. coli</i> Top10	pBS3Clux_Pveg/purE	Plasmídeo pBS3Clux com Promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i>	AMP	Este estudo
17	<i>E. coli</i> Top10	pBS2E_sRNA(purE)/ Pgrac	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch purE</i>	AMP	Este estudo
18	<i>E. coli</i> Top10	pBS3Clux_srfA/pbuG	Plasmídeo pBS3Clux com promotor constitutivo forte <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch pbuG</i>	AMP	Este estudo
19	<i>E. coli</i> Top10	pBS3Clux_srfA/pbuE	Plasmídeo pBS3Clux com promotor constitutivo forte <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch pbuE</i>	AMP	Este estudo
20	<i>E. coli</i> Top10	pBS3Clux_srfA/nupG	Plasmídeo pBS3Clux com promotor constitutivo forte <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch nupG</i>	AMP	Este estudo
21	<i>E. coli</i> Top10	pBS3Clux_srfA/xpt	Plasmídeo pBS3Clux com promotor constitutivo forte <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i>	AMP	Este estudo
22	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_sRNA (purE)/ Pgrac_lacI	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch purE</i> e o gene <i>lacI</i> inserido	AMP	Este estudo

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

Número	Linhagem hospedeira	Plasmídeo	Descrição	Resistência	Referência
23	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_lacI	Plasmídeo pBS2E com o gene <i>lacI</i> inserido	AMP	Este estudo
24	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_sRNA (purE)-RiboJ/Pgrac	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch purE</i> fusionado à RiboJ	AMP	Este estudo
25	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_lacI_sRNA(purR)/Pgrac	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o gene <i>purR</i> e o gene <i>lacI</i> inserido	AMP	Este estudo
26	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_sRNA (purE)-RiboJ/Pgrac_lacI	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch purE</i> fusionado à RiboJ e o gene <i>lacI</i> inserido	AMP	Este estudo
27	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_Pgrac/sRNA(xpt)	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch xpt</i>	AMP	Este estudo
28	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_Pgrac/sRNA(pbuE)	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch pbuE</i>	AMP	Este estudo
29	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_Pgrac/sRNA(pbuG)	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch pbuG</i>	AMP	Este estudo
30	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_Pgrac/sRNA(nupG)	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch nupG</i>	AMP	Este estudo
31	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_Pgrac/sRNA(ribDG)	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch ribDG</i>	AMP	Este estudo
32	<i>E. coli</i> DH5alfa	pBS2E_sRNA (purR)/Pgrac	Plasmídeo pBS2E contendo Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o gene <i>purR</i>	AMP	Este estudo

Na tabela 4, estão descritas as linhagens geradas neste estudo, as quais, foram criadas para caracterizar os *riboswitches* de purinas e FMN, assim como, avaliação da funcionalidade dos sRNAs *in vivo* e confirmar o papel regulatório do sistema de sRNAs sintéticos para reprogramação de metabolismos.

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).

Nº	Nomenclatura da linhagem	Descrição	Resistência
1	<i>Bacillus subtilis::srfA/luxABCDE</i>	Integração do operon <i>luxABCDE</i> responsável pela bioluminescência no <i>locus sacA</i> , sob controle do promotor <i>srfA</i>	CN
2	<i>B. subtilis::luxABCDE</i>	Vetor integrado no <i>locus sacA</i> de <i>B. subtilis</i> contendo operon <i>luxABCDE</i> para bioluminescência	CN
3	<i>B. subtilis::grac/</i> <i>RNA-Broccoli</i>	Integração do RNA-Broccoli no <i>locus amyE</i> de <i>B. subtilis</i> , sob controle do promotor <i>grac</i>	CN
4	<i>B. subtilis::veg/purE</i>	Plasmídeo pBS3Clux integrado no <i>locus sacA</i> contendo o promotor constitutivo forte <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch</i> do operon <i>pur</i>	CN
5	<i>B.subtilis::veg/purE/lux::sRNA(purE)/grac</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
6	<i>B. subtilis::srfA/pbuE/lux</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch pbuE</i> integrado no <i>locus sacA</i>	CN
7	<i>B.subtilis::srfA/nupG/lux</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch nupG</i> integrado no <i>locus sacA</i>	CN
8	<i>B.subtilis::srfA/pbuG/lux</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srf</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch pbuG</i> integrado no <i>locus sacA</i>	CN
9	<i>B. subtilis::srfA/xpt/lux</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrado no <i>locus sacA</i>	CN
10	<i>B. subtilis:: srfA/xpt/lux:: grac/sRNA(xpt)</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA desenhado para o <i>riboswitch xpt</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
11	<i>B. subtilis::veg/purE/lux:: sRNA(purE)-RiboJ/grac</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>purE</i>) fusionado à RiboJ integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
12	<i>B. subtilis::srfA/pbuE/lux:: grac/sRNA(pbuE)</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch pbuE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>pbuE</i>) integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
13	<i>B. subtilis::srfA/nupG/lux:: grac/sRNA(nupG)</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch nupG</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>nupG</i>) integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
14	<i>B. subtilis:: grac/sRNA(pbuE)</i>	Plasmídeo pBS2E com promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>pbuE</i>) integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
15	<i>B. subtilis:: srfA/pbuE/lux::2E</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch pbuE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E vazio integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI

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

Nº	Nomenclatura da linhagem	Descrição	Resistência
16	<i>B. subtilis</i> :: <i>veg/purE/lux</i> :: <i>sRNA(purE)-RiboJ/grac_lacI</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purE)</i> fusionado à <i>RiboJ</i> integrado no <i>locus lac</i> . Gene <i>lacI</i> também foi inserido ao cromossomo.	CN e ERI
17	<i>B. subtilis</i> :: <i>veg/purE/lux</i> :: <i>2E_lacI</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E vazio e gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
18	<i>B. subtilis</i> :: <i>srfa/xpt/lux</i> :: <i>2E</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfa</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E vazio integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
19	<i>B. subtilis</i> :: <i>sRNA(purE)/grac</i>	Plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purE)</i> integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
20	<i>B. subtilis</i> :: <i>sRNA(purE)/grac_lacI</i>	Plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purE)</i> e gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
21	<i>B. subtilis</i> :: <i>veg/purE/lux</i> :: <i>sRNA(purE)/grac_lacI</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purE)</i> e gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
22	<i>B. subtilis</i> :: <i>lacI_sRNA(purR)/grac</i>	Plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purR)</i> e gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
23	<i>B. subtilis</i> :: <i>srfa/xpt/lux</i> :: <i>lacI_sRNA(purR)/grac</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfa</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purR)</i> e gene <i>lacI</i> integrados no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
24	<i>B. subtilis</i> :: <i>sRNA(ribDG)/grac</i>	Plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(ribDG)</i> integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
25	<i>B. subtilis</i> :: <i>sRNA(purE)-RiboJ/grac_lacI</i>	Plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purE)</i> fusionado à <i>RiboJ</i> e gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
26	<i>B. subtilis</i> :: <i>veg/purE/lux</i> :: <i>sRNA(purE)-RiboJ/grac_lacI</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purE)</i> fusionado à <i>RiboJ</i> e gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
27	<i>B. subtilis</i> :: <i>veg/purE/lux</i> :: <i>lacI_sRNA(purR)/grac</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e plasmídeo pBS2E contendo promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do <i>sRNA(purR)</i> e gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
28	<i>B. subtilis</i> :: <i>2E</i>	Vetor vazio integrado no <i>locus lacA</i> de <i>B. subtilis</i>	ERI
29	<i>B. subtilis</i> :: <i>2E_lacI</i>	Vetor contendo o gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i> de <i>B. subtilis</i>	ERI

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

Nº	Nomenclatura da linhagem	Descrição	Resistência
30	<i>B. subtilis::srfA/xpt/lux::2E_lacI</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrado no <i>locus sacA</i> e vetor pBS2E contendo o gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
31	<i>B. subtilis::veg/purE/lux::2E_lacI</i>	Plasmídeo pBS3Clux com promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrado no <i>locus sacA</i> e vetor pBS2E contendo o gene <i>lacI</i> integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
32	<i>B. subtilis::sRNA(purE)-RiboJ/grac</i>	Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>purE</i>) fusionado à RiboJ integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
33	<i>B. subtilis::sRNA(purR)/grac</i>	Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>purR</i>) integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
34	<i>B. subtilis::grac/sRNA(xpt)</i>	Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>xpt</i>) integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
35	<i>B. subtilis::veg/purE/lux::grac/sRNA(xpt)</i>	Promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrados no <i>locus sacA</i> e promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>xpt</i>) integrados no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
36	<i>B. subtilis::srfA/xpt/lux::sRNA(purE)/grac</i>	Promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrados no <i>locus sacA</i> e promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>purE</i>) integrados no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
37	<i>B. subtilis::srfA/xpt/lux::sRNA(purE)-RiboJ/grac</i>	Promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrados no <i>locus sacA</i> e promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>purE</i>) fusionado à RiboJ integrados no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
38	<i>B. subtilis::srfA/xpt/lux::2E</i>	Promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrados no <i>locus sacA</i> e veto vazio integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
39	<i>B. subtilis::grac/sRNA(nupG)</i>	Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>nupG</i>) integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
40	<i>B. subtilis::grac/sRNA(pbuG)</i>	Promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>pbuG</i>) integrado no <i>locus lacA</i>	ERI
41	<i>B. subtilis::veg/purE/lux::2E</i>	Promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrados no <i>locus sacA</i> e veto vazio integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
42	<i>B. subtilis::srfA/pbuG/lux::2E</i>	Promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch pbuG</i> integrados no <i>locus sacA</i> e veto vazio integrado no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
43	<i>B. subtilis::veg/purE/lux::sRNA(purR)/grac</i>	Promotor <i>veg</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch purE</i> integrados no <i>locus sacA</i> e promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>purR</i>) integrados no <i>locus lacA</i>	CN e ERI
44	<i>B. subtilis::srfA/xpt/lux::sRNA(purR)/grac</i>	Promotor <i>srfA</i> controlando a transcrição do <i>riboswitch xpt</i> integrados no <i>locus sacA</i> e promotor <i>grac</i> controlando a transcrição do sRNA(<i>purR</i>) integrados no <i>locus lacA</i>	CN e ERI

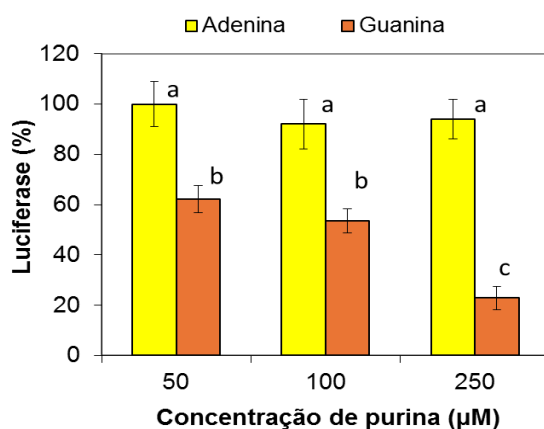
5.3 Desenvolvimento de metodologia para expressão gênica *in vitro* de *riboswitches*

A funcionalidade dos *riboswitches* em regular os genes do metabolismo de purinas é descrita na literatura com base no papel que desempenham na síntese *de novo* ou na produção de proteínas de importação ou exportação. Elaborou-se uma metodologia para expressão gênica *in vitro* dos *riboswitches* de purinas para verificar sua função após ligação do metabólito podendo ser aplicada em diferentes sistemas gênicos contendo riborreguladores.

A reação de expressão gênica *in vitro* foi inicialmente padronizada com o *riboswitch purE*. Reações foram desenvolvidas com adição de três diferentes concentrações de guanina e adenina (50, 100 e 250 μM) e comparadas com a reação controle na ausência de purinas. Afim de melhorar também as condições da reação, foram testadas em duas temperaturas de 30 e 37°C, variação do tempo de 15 e 20 minutos e algumas concentrações do plasmídeo com o *riboswitch* (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$).

O *riboswitch purE* reprimiu a expressão de *luc* na presença de guanina, levando a diminuição da bioluminescência em até 80% na maior concentração testada. Houve diferença estatística também com 50 e 100 μM da guanina, apresentando redução significativa na expressão do *luc* entre 40-50%. A adenina não ativou a atividade regulatória realizada pelo *riboswitch*, indicando que esse é altamente sensível apenas à presença de guanina (Figura 14).

Figura 14- Caracterização *in vitro* da funcionalidade do *riboswitch purE* na presença de guanina e adenina variando as concentrações 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.



Fonte: o autor.

A partir destes dados, ficaram padronizadas as reações em 30°C por 20 minutos utilizando a concentração de 50 µM dos ligantes, a qual resultou em repressão significativa da expressão gênica. Adicionalmente, nesta concentração, o preparo e manipulação da solução são facilitados, pois a característica hidrofóbica da guanina dificulta a sua solubilização em soluções mais concentradas. Foi dado prosseguimento às caracterizações dos outros *riboswitches* de purinas e FMN utilizando o método para expressão gênica *in vitro* desenvolvida nesta etapa.

5.4 Caracterização da funcionalidade dos *riboswitches*

5.4.1 Expressão gênica *in vitro*

Os quatro plasmídeos contendo cada *riboswitch* de purina (*purE*, *nupG*, *pbuE* e *xpt*) e o *riboswitch* de flavina (*ribDG*) clonados entre o promotor *Prib* de *E. coli* e o gene repórter *luc* foram caracterizados após reações de transcrição e tradução *in vitro*, obtendo-se a quantificação da expressão gênica pela determinação da produção de luz após reação da luciferase produzida sobre os substratos luciferina e ATP. Os mapas dos plasmídeos estão apresentados no apêndice A.

Após extração e purificação dos plasmídeos contendo os sistemas dos *riboswitches* controlando a expressão do gene *luc*, foi determinada a atividade luciferase (%) na presença e ausência dos ligantes adenina, guanina e FMN para observar o efeito da riborregulação do gene *luc*.

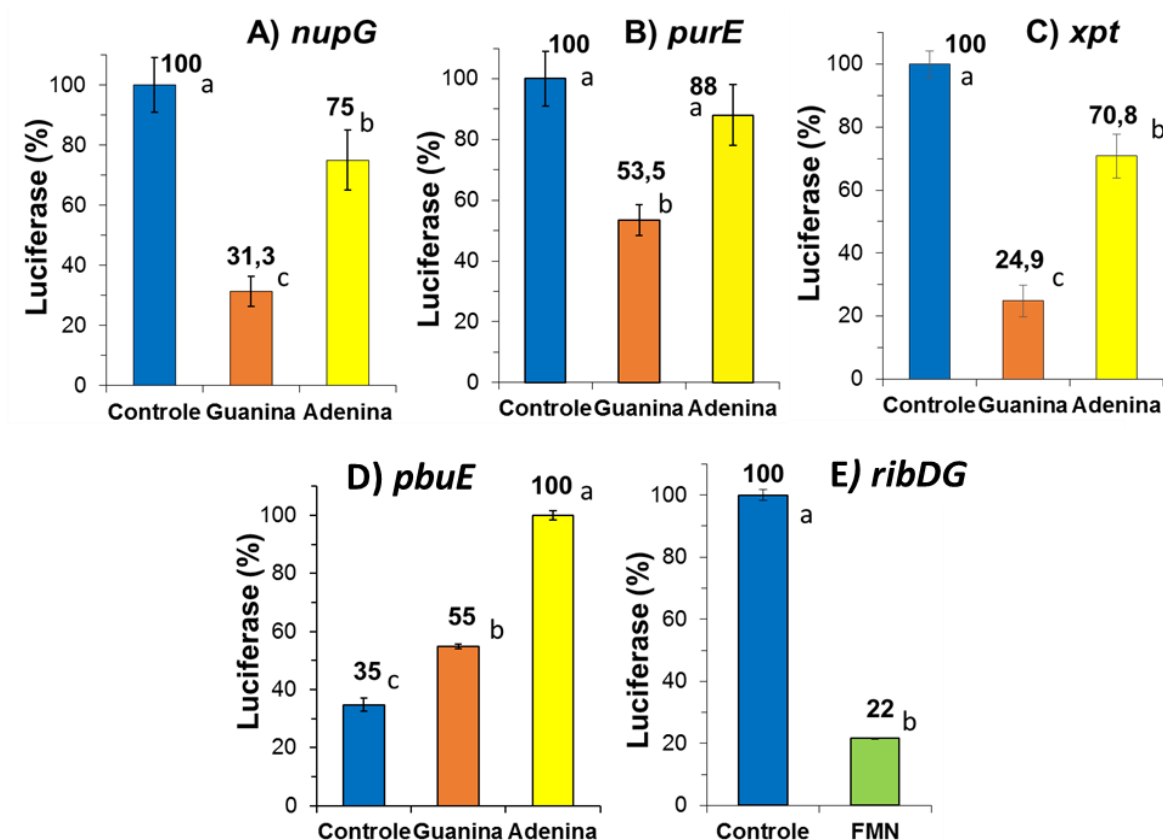
Os *riboswitches* *nupG*, *purE* e *xpt* reprimiram consideravelmente a expressão de *luc* na presença de guanina em até 75%. Na presença de adenina, também houve alguma diminuição da expressão, entretanto em menor proporção. Como a adenina apresenta estrutura semelhante à guanina, esta pode ser indevidamente reconhecida por *riboswitches* de guanina. Ainda assim, fica clara a especificidade dos *riboswitches* pela guanina (Figura 15 A, B e C). Os *riboswitches* de guanina foram capazes de se ligar ao metabólito específico e, assim, reprimir a expressão do gene da luciferase.

O *riboswitch* *pbuE* ativa a expressão do gene *luc*, provocando acentuado aumento da expressão na presença de adenina. Esse efeito é observado em escala bem menor quando guanina é adicionada à reação. Este *riboswitch* é descrito como o único no metabolismo de purinas que regula positivamente quando há adenina ligada ao aptâmero (Figura 15 D).

O *riboswitch* de FMN reduziu fortemente a expressão de *luc* na presença deste metabólito, como também era esperado devido à função celular que desempenha. Quando há muita flavina 5'-monofosfato (FMN) intracelular, ocorre a repressão da expressão gênica como forma de evitar produção excessiva da coenzima (Figura 15 E).

Estes resultados indicam que os *riboswitches* avaliados de fato são capazes de regular a expressão do gene *luc* positiva ou negativamente. Além disso, o sistema *in vitro* estabelecido neste estudo é adequado para testar a funcionalidade de *riboswitches* de purinas, mas pode ser aplicado para caracterização de outros tipos, como o do FMN, que sejam ativadores ou repressores da expressão gênica.

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.



Fonte: o autor.

5.4.2 Funcionalidade *in vivo* dos *riboswitches* em *Bacillus subtilis*

Nosso grupo de pesquisa avaliou a força dos promotores *Pveg* e *PsrfA* para expressão gênica de proteínas de interesse (dados não publicados). Inicialmente foi pensado em usar o promotor *Pveg* nos sistemas para avaliar *in vivo* os *riboswitches*, entretanto, o promotor *PsrfA* apresentou melhores resultados e, portanto, foi decidido continuar as construções utilizando esse *biobrick* para iniciar a transcrição gênica.

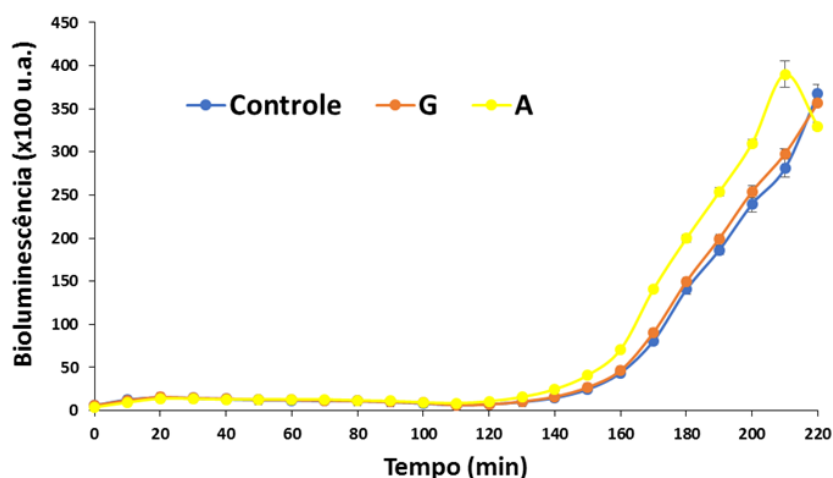
Os *riboswitches* foram clonados *upstream* ao operon da bioluminescência para confirmar *in vivo*, nas células de *B. subtilis*, a função de regular positiva ou negativamente o operon em tempo real e associar ao seu papel com o metabolismo de purinas.

Foram construídos plasmídeos pBS3Clux_riboswitch/luxABCDE (mapas descritos no apêndice B). Estes plasmídeos foram integrados ao cromossomo de *B. subtilis* 168 no locus *sacA*, gerando quatro linhagens de *B. subtilis*::riboswitch/luxABCDE (*riboswitches purE*, *nupG*, *pbuE* e *xpt*) para avaliar o comportamento dos mesmos *in vivo* na presença ou não dos ligantes guanina e adenina. Também foi gerada uma linhagem *B. subtilis*::luxABCDE, sem o *riboswitch*, para ser utilizada como controle positivo nos ensaios *in vivo*.

As linhagens *B. subtilis*::riboswitch/luxABCDE foram submetidas aos ensaios de funcionalidade *in vivo*. Leituras de densidade óptica e luminescência foram medidas durante aproximadamente quatro horas, ou fase inicial da *log*, e realizados os tratamentos de controle e na presença de guanina e adenina.

Na figura 16, verifica-se que o controle *B. subtilis*::luxABCDE apresentou bioluminescência na mesma proporção de seu crescimento, exibindo dados semelhantes entre os tratamentos, indicando que nem o promotor nem as purinas interferem na expressão do operon *luxABCDE* não regulado por *riboswitch*.

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 μ M; A: adenina 50 μ M).

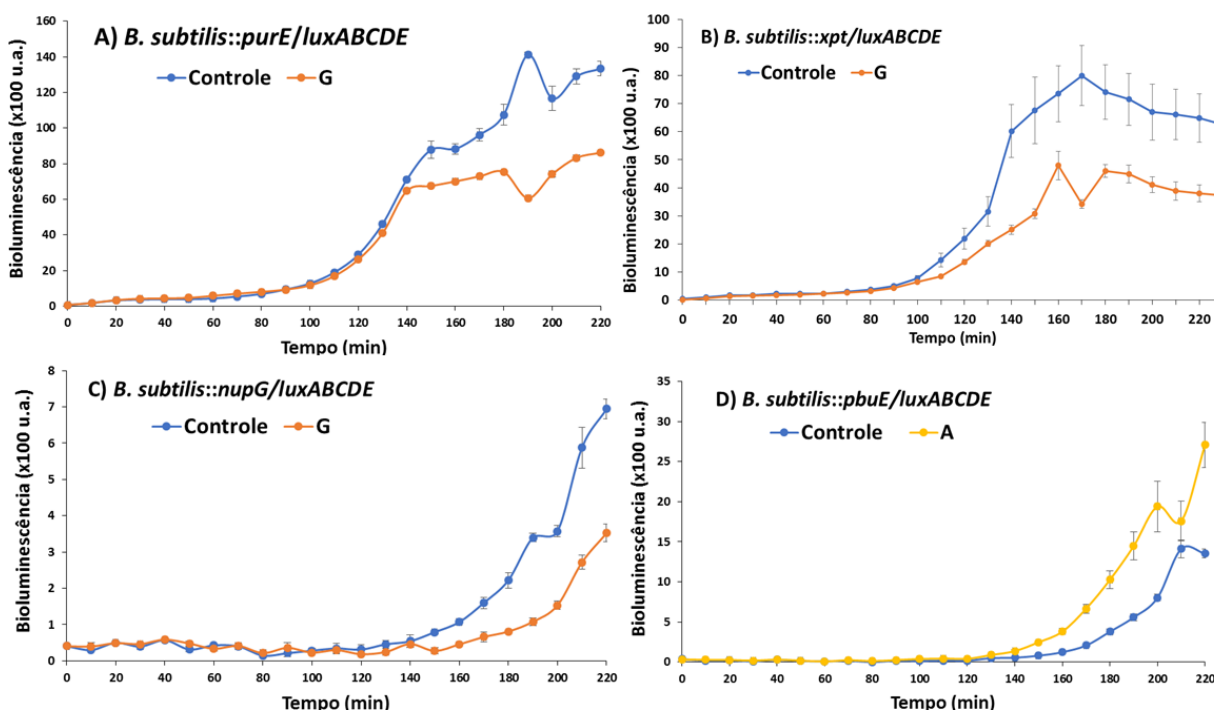


Fonte: o autor.

A bioluminescência das linhagens *B. subtilis::riboswitch/luxABCDE* diminuiu na presença da guanina quando comparados aos controles, sugerindo que os *riboswitches* foram capazes de se ligar a guanina para regular a expressão do operon *luxABCDE* no início da fase *log* de crescimento (Figura 17 A, B e C). O mecanismo de repressão destes *riboswitches* foi demonstrado tanto na expressão gênica *in vitro* quanto *in vivo*, confirmando a especificidade dos aptâmeros em ligar a guanina.

O *riboswitch pbuE* aumentou a expressão gênica do operon na presença de adenina (Figura 17 D), demonstrando sua afinidade pelo metabólito e indicando seu papel de ativação no metabolismo de purinas em *B. subtilis*.

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 μ M; A: adenina 50 μ M).



Fonte: o autor.

Inicialmente no crescimento bacteriano, as purinas são intensamente sintetizadas para suprir a demanda celular por esses metabólitos. À medida que estas acumulam-se na célula, os *riboswitches* são ativados, empregando mecanismos de interrupção da biossíntese e exportação para o meio extracelular, promovendo economia de energia e reduzindo a toxicidade para a célula. Linhagens de *B. subtilis* contendo o sistema *riboswitch/luxABCDE* se comportaram como o esperado, pois, no momento em que a concentração de guanina celular se elevou, o metabólito ligou-se ao aptâmero com especificidade e interrompeu a expressão do operon. O inverso foi observado para o *riboswitch* que regula o gene *pbuE*. Durante o crescimento do microrganismo, o *riboswitch* se liga a adenina e assim favorece a expressão do operon *lux*.

Os dados obtidos nos ensaios *in vivo* confirmam a caracterização *in vitro* destes *riboswitches* realizada neste estudo, indicando que a metodologia desenvolvida para expressão gênica *in vitro* é funcional e sugere que estes *riboswitches* apresentam papel regulador no metabolismo de purinas.

5.5 Pequenos RNAs sintéticos como ferramenta de riborregulação

5.5.1 Design e avaliação *in silico* dos sRNAs

Inicialmente, neste trabalho foi idealizado o desenho de apenas um sRNA que fosse capaz de interferir na estrutura secundária dos quatro *riboswitches* de purinas, através de uma sequência consenso, pois as sequências de nucleotídeos da região dos aptâmeros são conservadas. Entretanto, através de análises no software NUPACK foi verificado que não seria possível apenas um sRNA interferir em todos os *riboswitches*, e por isto, foram desenhados sRNAs para cada um de acordo com cada sequência.

A construção de apenas um sRNA não foi possível, pois haveria mais de uma possibilidade de interação com as sequências dos *riboswitches* além de interação entre a própria fita do sRNA, apresentando ΔG° desfavorável. Provavelmente este efeito indica que regiões não-conservadas dos *riboswitches* (aproximadamente 40%) possuem importância na conformação das estruturas (SERGANOV *et al.*, 2004).

Os sRNAs foram desenhados para hibridização com os aptâmeros dos *riboswitches* visando interferir na estrutura secundária da plataforma de expressão, e assim, interferir no papel regulador seja pela iniciação ou término prematuro da transcrição. Na tabela 5 estão apresentadas as sequências dos sRNAs sintéticos projetados para cada *riboswitch* do metabolismo de purina e FMN utilizando o software Ribomaker.

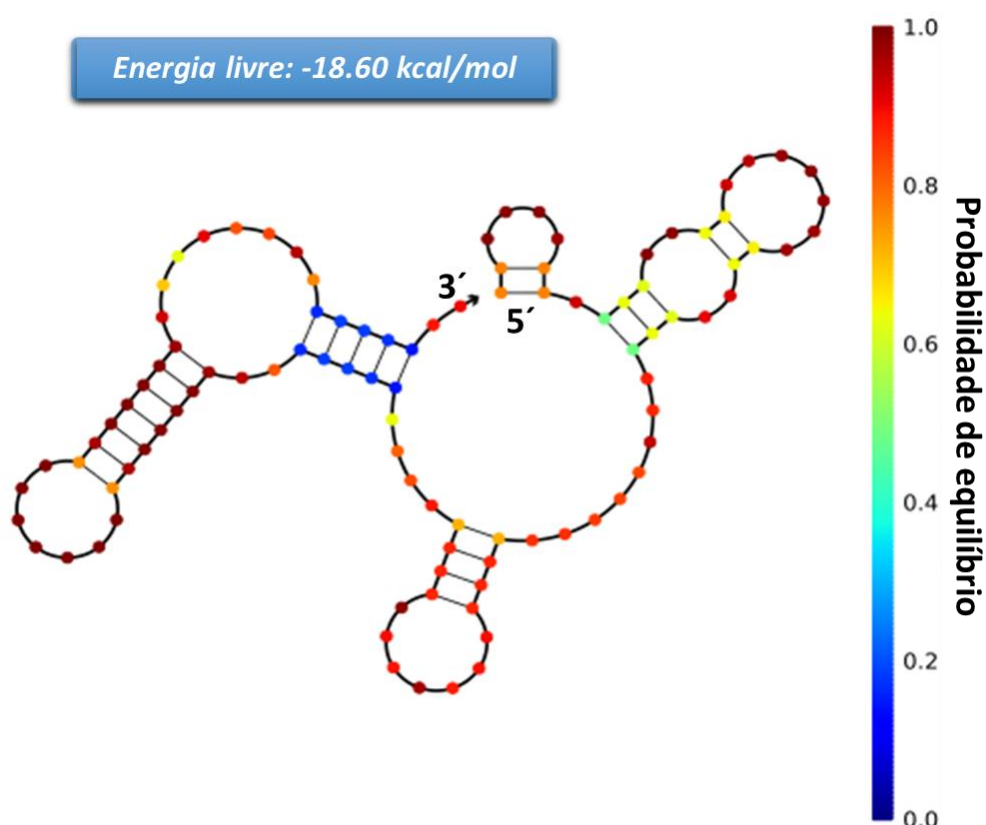
Tabela 5- Sequências 5'-3' dos sRNAs geradas no software Ribomaker com o objetivo de hibridizar com os *riboswitches* de guanina, adenina e FMN em *Bacillus subtilis*.

sRNAs	Sequências (5'-3')
sRNA (<i>purE</i>)	GAUUCAACAAUUAUGUGAGGUCGUGUUUCUCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCU UUUCUGU
sRNA (<i>xpt</i>)	CCAUAUCUACGAUGAGAGUUGUGUCCAAGCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCU UUUCUGU
sRNA (<i>nupG</i>)	GAUCAUGUACGAGGAUGGCUUGUUUCUGACCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCU UUUCUGU
sRNA (<i>pbuE</i>)	CCAUAGGUUAUACAAGUGAUGAGAGACGCCCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCU UUUCUGU
sRNA (<i>ribDG</i>)	CCUAUCCUGGCUCGGAAGGGUGCAUAUUCACCAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCU UUUCUGU
	Nucleotídeos em vermelho: sequência do terminador da transcrição T500.

Fonte: o autor.

Após a geração das sequências dos sRNAs sintéticos, o software NUPACK foi empregado para simular as condições termodinâmicas de interação entre cada sRNA e o *riboswitch* associado. Foi observado que a energia livre representada pelo ΔG° (calculado em kcal/mol) foi favorável para todas as simulações com probabilidade de equilíbrio cerca de 100% (1,0). A figura 18 representa a estrutura secundária do *riboswitch* que regula o gene o *purE* do metabolismo de purinas em *B. subtilis*: os círculos coloridos representam cada nucleotídeo e o espectro de cores simula a probabilidade de hibridização dos ribonucleotídeos, variando do azul escuro (nenhuma probabilidade) para o vermelho escuro (aproximadamente 100% de probabilidade).

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.

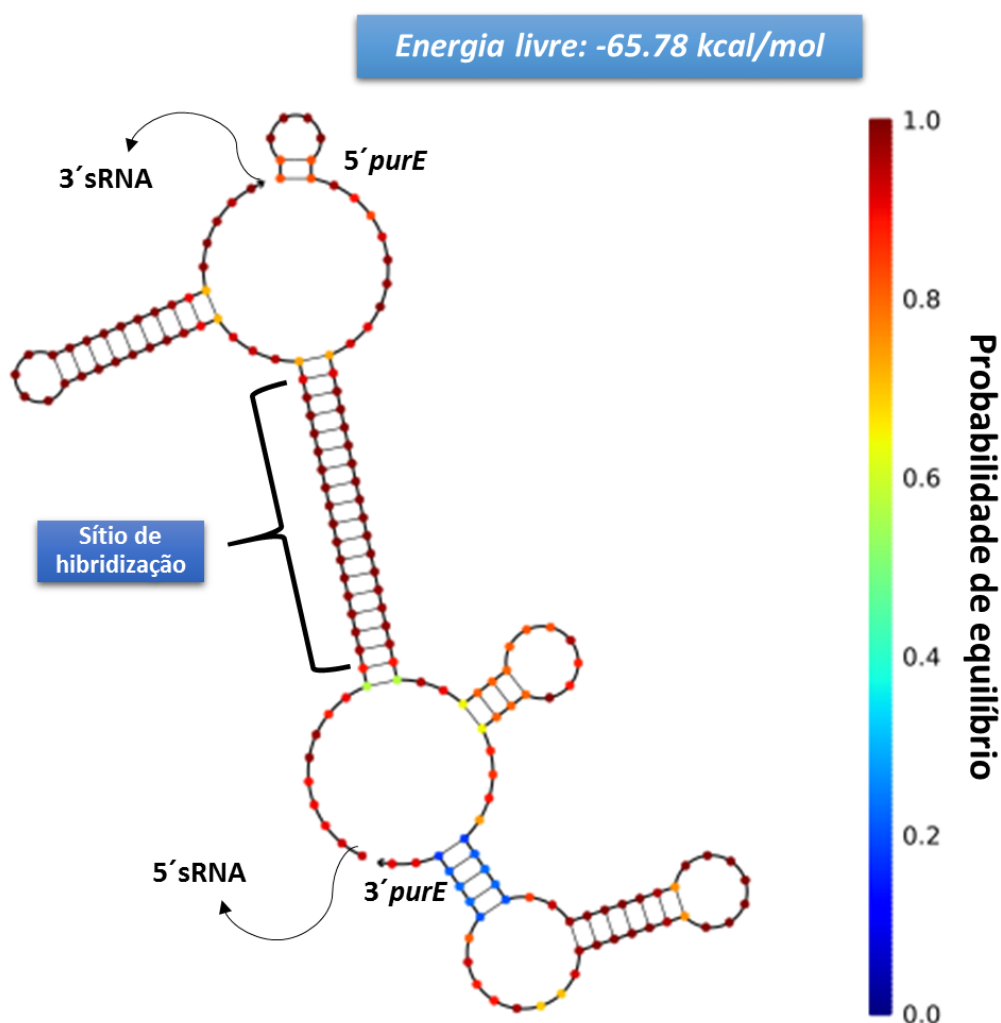


Fonte: o autor.

A estrutura secundária do complexo *riboswitch*-sRNA foi também simulada e indica que há apenas uma possibilidade de interação entre as partes e alta probabilidade de

hibridização entre os ribonucleotídeos complementares do complexo. Foram observadas alterações na estrutura do *riboswitch* sugerindo que provavelmente ocorreria interferência na regulação gênica. A partir do 18º nucleotídeo do alvo, constata-se que há alta probabilidade de hibridização por pareamento Watson-Crick com o sRNA específico (Figura 19).

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.



Fonte: o autor.

As simulações das estruturas dos outros *riboswitches* de purina e FMN, assim como, dos complexos com cada sRNA estão representadas no apêndice C deste estudo. Os sRNAs foram arquitetados para impedir a modulação da expressão gênica do *luc* pelos *riboswitches* mesmo em altas concentrações de guanina ou adenina ou FMN, gerando níveis similares ou maiores de luciferase na presença e na ausência dos metabólitos. Assim, após o *design* e

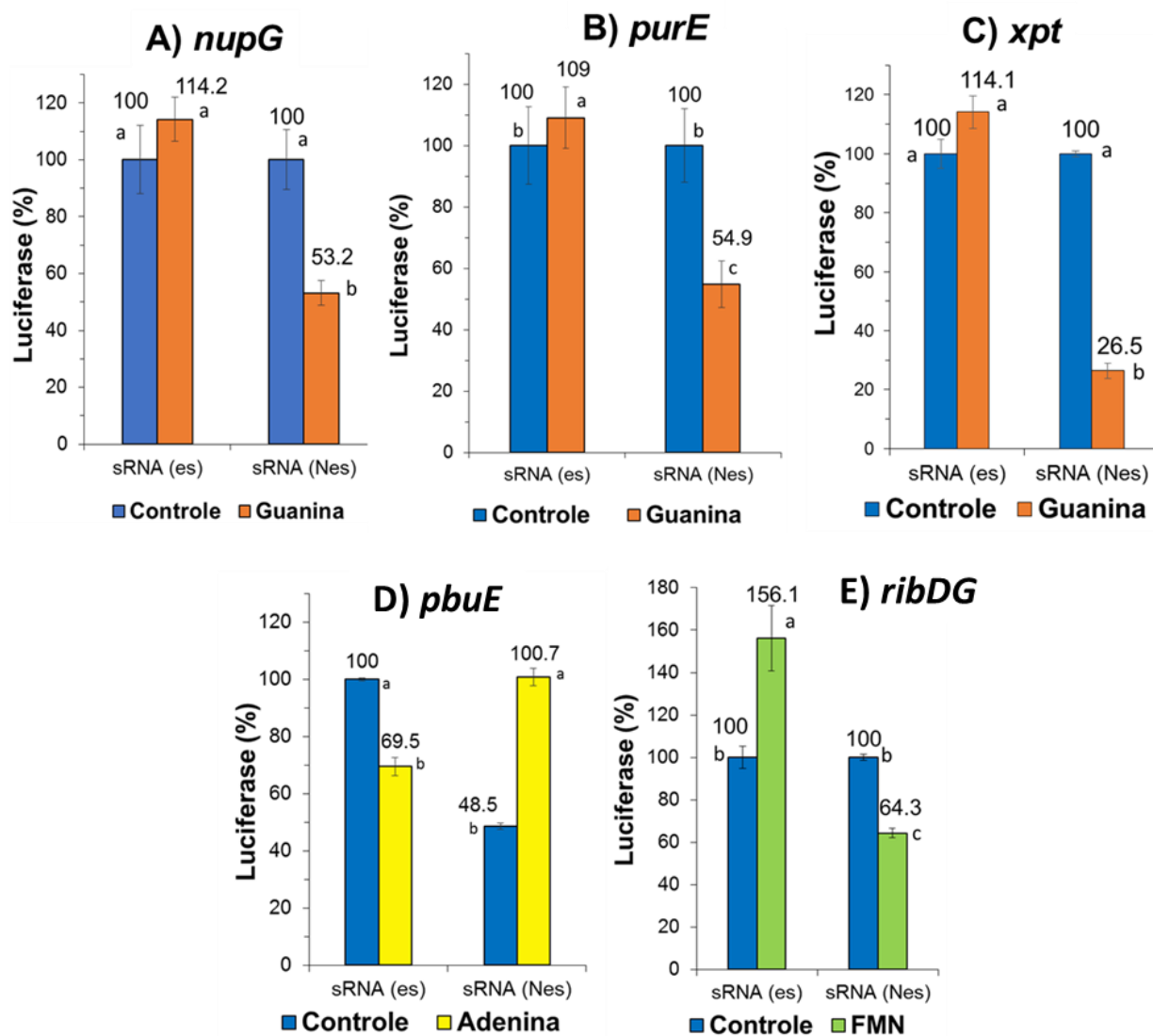
avaliação *in silico*, os sRNAs foram sintetizados e testados *in vitro* na presença dos *riboswitches* e ligantes para análise de sua funcionalidade.

5.5.2 Funcionalidade dos sRNAs *in vitro*

Os sRNAs foram avaliados na presença dos *riboswitches* e dos ligantes guanina ou adenina ou FMN. Os *riboswitches nupG*, *purE* e *xpt* sem o sRNA, foram capazes de regular o gene *luc*, diminuindo sua expressão na presença de guanina em relação ao controle. Entretanto, nas reações contendo os sRNAs específicos [sRNA(es)], mesmo na presença de guanina, estes interferiram na regulação dos *riboswitches* elevando a expressão do gene da luciferase 61,0, 54,1 e 87,6%, respectivamente, quando comparado aos sRNAs não-específicos [sRNA(Nes)]. Estes sRNAs(Nes), como esperado, não foram capazes de impedir a regulação negativa causada pelos *riboswitches* (Figura 20 A, B e C).

O efeito do sRNA(*pbuE*) interferiu na regulação que seria causada pelo *riboswitch pbuE* e foi observada a repressão do gene *luc* em 31% na presença de adenina (Figura 20D). O *riboswitch* específico para o FMN em complexo com o sRNA aumentou a expressão de *luc* em 91,8% mesmo na presença deste metabólito (Figura 20E). Os sRNAs não-específicos não foram capazes de impedir a regulação realizada pelos *riboswitches*.

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.



Fonte: o autor.

O software Ribomaker se mostrou útil e aplicável no design dos sRNAs sintéticos podendo ser utilizados como ferramentas para regulação de genes. Nosso objetivo foi interromper a riborregulação exercida pelos *riboswitches* que regulam genes do metabolismo de purinas utilizando pequenos RNAs sintéticos, e foi confirmada *in vitro*. Como observado, estes sRNAs são funcionais interferindo de forma altamente específica na expressão gênica do gene *luc*, mesmo na presença dos ligantes. Portanto, é viável a criação de uma nova linhagem com esses sRNAs integrados ao genoma, e assim, possibilitar a produção de metabólitos de

interesse comercial pela elevada concentração intracelular de bases purínicas, que são essenciais a diversos metabolismos.

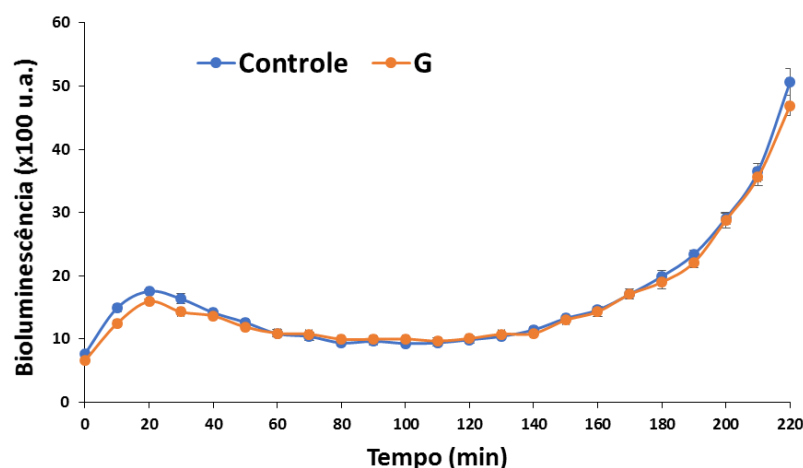
5.5.3 Ensaio preliminar *in vivo* com sRNA(*purE*)

Para avaliar exatamente como o sRNA iria interferir na regulação na presença dos ligantes e também após indução por IPTG, foi construída uma linhagem contendo todo o sistema de indução LacI e os microcultivos foram realizados na presença dos ligantes.

B. subtilis::purE/luxABCDE::sRNA(purE) foi submetido a novas análises com indução por IPTG (após inclusão do sistema *lacI* no cromossomo) e na presença e ausência da guanina para avaliar a funcionalidade do sRNA num amplo espectro de possibilidades.

Foi observado que após a indução por IPTG e mesmo na presença de guanina, o sRNA foi capaz de neutralizar o efeito regulador do *riboswitch purE*, apresentando dados de bioluminescência semelhantes ao controle (Figura 21). Portanto, o sRNA, cujo alvo é o *riboswitch purE*, funciona como esperado também *in vivo*.

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 μ M).



Fonte: o autor.

5.5.4 Ensaios *in vivo* dos sRNAs em *B. subtilis*

Cada sRNA foi clonado no plasmídeo pBS2E, sendo sua a transcrição regulada pelo promotor *Pgrac*, inicialmente na ausência do gene *lacI*, caracterizando-se como constitutivo. Os mapas dos plasmídeos estão descritos no apêndice D. A sequência com o sRNA se integra

ao genoma de *B. subtilis* por meio de recombinação homóloga *double cross-over*, pois possui homologia com o locus *lacA* do genoma.

Cada sistema com o sRNA específico foi integrado ao genoma de *B. subtilis::riboswitches/luxABCDE*, para avaliar a funcionalidade *in vivo* dos sRNAs e confirmar esta nova tecnologia para manipulação das vias do metabolismo de purinas.

Além destas linhagens, foram criados *B. subtilis* contendo apenas o sistema de sRNAs integrado ao cromossomo para quantificação de purinas por HPLC e confirmar o uso dessa nova tecnologia para reprogramação do metabolismo de purinas em *B. subtilis*.

Ensaio com os pares *riboswitch*-sRNA foram realizados para verificar a funcionalidade dos sRNAs no bloqueio da ação reguladora pelos *riboswitches*, confirmando a ação desta nova ferramenta de regulação gênica no metabolismo de purina e riboflavina no *B. subtilis*.

Para os testes com os sRNAs, as condições de cultivo foram mantidas, entretanto foi decidido não adicionar os ligantes guanina e adenina, pois naturalmente microrganismos os sintetizam utilizando a via *de novo* ou importam do meio extracelular. Como a intenção foi contrapor a regulação desencadeada por concentrações normais de purina, foi decidido avaliar a resposta sem a adição dos metabólitos, simulando assim a produção industrial em biorreator da linhagem reprogramada com a tecnologia do sRNA.

Além disso, o promotor *grac*, usado para controlar a expressão do sRNA, responde ativando a transcrição de forma constitutiva na ausência de LacI. O IPTG tem efeito deletério no crescimento de microrganismos e, portanto, os experimentos com o sRNA(*purE*) e os outros sRNAs foram realizados sem indução por IPTG, melhorando o crescimento e robustez dos clones.

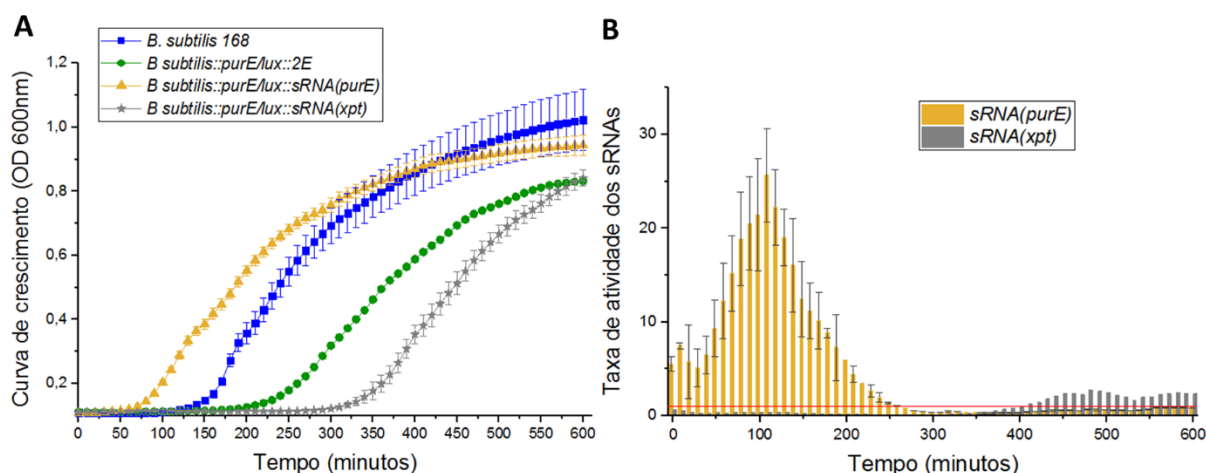
Para avaliar a funcionalidade dos sRNAs, foram calculadas as taxas de ativação do sRNA que correspondem a quanta vezes mais a linhagem reprogramada produz bioluminescência em relação ao microrganismo controle sem o sRNA. A taxa foi calculada pela razão entre a bioluminescência normalizada pela densidade óptica da linhagem reprogramada pela bioluminescência normalizada do controle.

B. subtilis reprogramado com o sRNA(*purE*) foi cultivado para avaliar a funcionalidade do sRNA em interferir na regulação da bioluminescência sem a indução por IPTG, e sem a adição de guanina ou adenina ao meio de cultura. *B. subtilis::purE/luxABCDE::sRNA(purE)* foi capaz de manter a bioluminescência em níveis similares ao controle (Figura 22 A e B), indicando que mesmo na presença elevada de purinas

endógenas, estes metabólitos não se ligam ao aptâmero, sugerindo mudança na conformação da estrutura pela hibridização do sRNA ao *riboswitch*, mantendo a produção de luciferase.

Um outro controle utilizado foi *B. subtilis::purE/luxABCDE::sRNA(xpt)*, obtido para avaliar a especificidade do sRNA, ou seja, se outros pequenos RNAs não iriam interferir na resposta regulatória do *riboswitch purE* (reposta cruzada). Foi observado que sRNA(*xpt*), apesar da semelhança estrutural e da própria sequência primária com o sRNA(*purE*), não interferiu na regulação causada pelo *riboswitch purE* no operon da bioluminescência, não apresentando, assim, reação cruzada (Figura 22 A e B).

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.



Fonte: o autor.

B. subtilis reprogramado com o sRNA(*purE*) apresentou efeito máximo (maior que 25 vezes) no início da fase *log* de crescimento e houve decréscimo da taxa de ativação do sRNA, e isto provavelmente não é devido à não-transcrição do sRNA, mas pelo fato que a luz não é acumulada na célula como ocorre aplicando-se outros genes repórter codificadores de proteínas.

O sRNA(*purE*) apresentou efeito na atividade do *riboswitch* que regula o operon *purE* mesmo estando em cópia única no genoma. Isto é uma característica importante e desejável para a indústria, pois, implica em um gasto energético menor para a bactéria reprogramada e

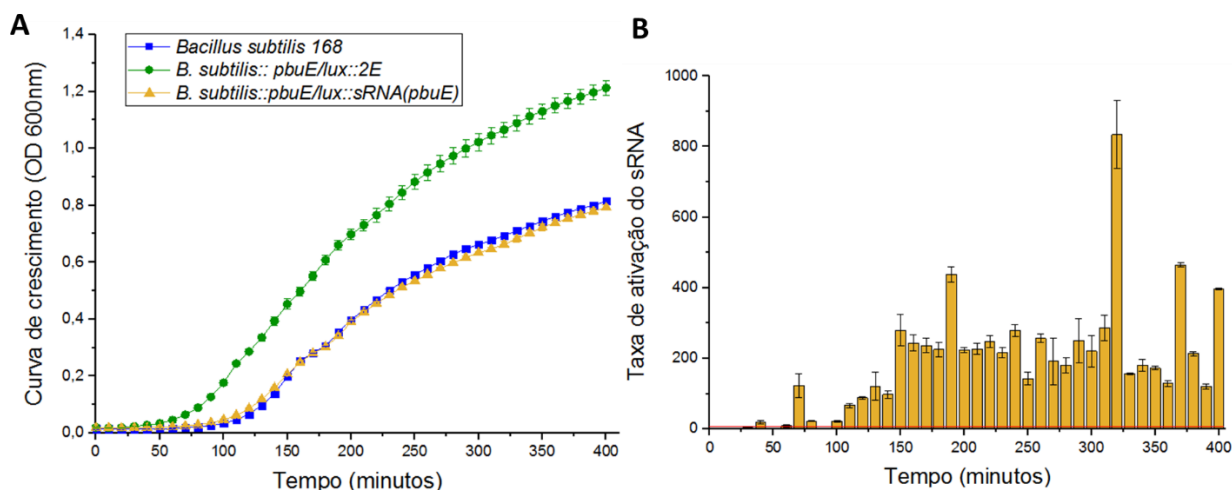
em estabilidade genética para impedir a regulação realizada pelo *riboswitch*. Além disso, o sRNA específico sRNA(*purE*) impactou positivamente o crescimento bacteriano, restaurando o crescimento máximo em densidade populacional compatível com o tipo selvagem (168). Ainda, encurtou a fase lag de crescimento, antecipando a fase produtiva (*log*).

Este efeito de aparente alívio do fardo metabólico é extremamente valioso para linhagens industriais, onde se busca alto rendimento com curto tempo de produção. Sugere-se que de alguma forma, o sRNA(*purE*) se hibridizou com o *riboswitch* natural desta linhagem, ocorrendo maior produção e acúmulo de guanina intracelular, facilitando o desenvolvimento do metabolismo primário e causando impacto positivo no crescimento.

B. subtilis reprogramado com o sRNA para impedir a regulação do *riboswitch pbuE* foi capaz de aumentar a expressão do operon *lux*, demonstrando sua funcionalidade após o design racional. *B. subtilis::pbuE/luxABCDE::sRNA(pbuE)* aumentou consideravelmente, maior que 800 vezes, a expressão da bioluminescência em relação ao tipo selvagem 168 e controle, indicando o sRNA aparentemente foi capaz de neutralizar o efeito regulador do *riboswitch* no final da fase *log* de crescimento (Figura 23 A e B).

Além disso, ao longo do cultivo, a bactéria reprograma aumentou cerca de 200 vezes a bioluminescência, e, mesmo com este fardo metabólico, ela foi capaz de crescer atingindo densidade óptica semelhante a *B. subtilis* selvagem. Isto indica que o sRNA não é tóxico para a célula e que se mostra uma ferramenta útil para reprogramação de metabolismos (Figura 23A e B).

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.



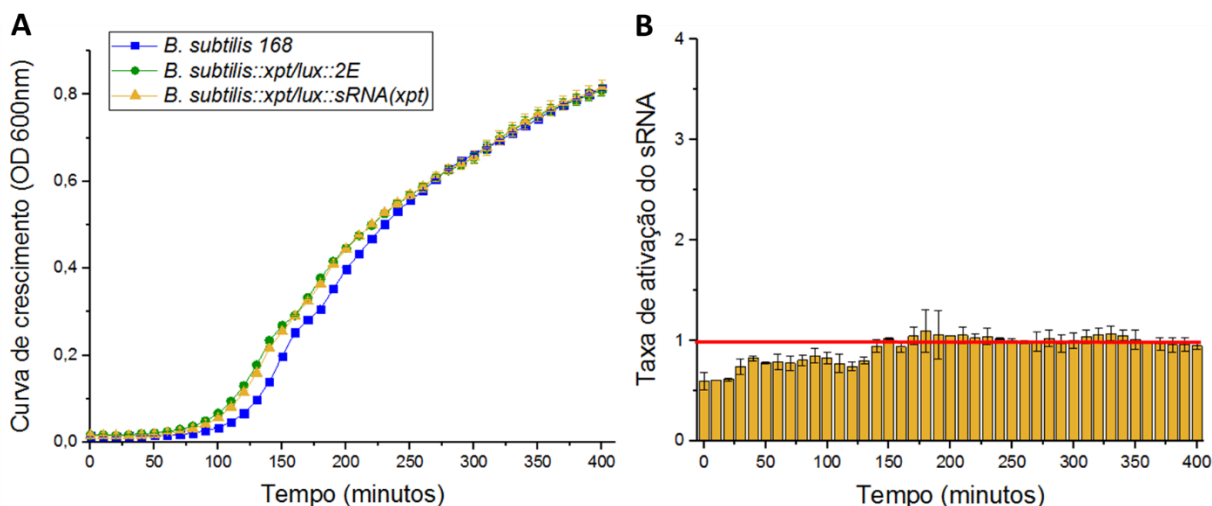
Fonte: o autor.

O comportamento natural do *riboswitch pbuE* específico para adenina é ativar a expressão quando este metabólito está ligado ao aptâmero. O controle contendo apenas o riborregulador apresentou níveis de bioluminescência bem menores indicando que a adenina não atingiu o limiar de concentração na célula para se ligar ao *riboswitch* e, portanto, não causou a ativação do operon da bioluminescência.

Os sRNAs desenhados para interferir na regulação causada pelos *ribowitches purE* e *pbuE* foram exemplarmente caracterizados tanto *in vitro* quanto em células de *B. subtilis*, sendo possível confirmar sua funcionalidade e especificidade após as análises.

Em relação ao *riboswitch xpt*, o sRNA(*xpt*) não apresentou atividade regulatória, não interferindo na taxa de expressão do operon *lux*. Os níveis de bioluminescência do sRNA(*xpt*) acompanharam os do controle sem o sRNA. A guanina produzida, após atingir um limiar de concentração durante o crescimento, provavelmente se ligou ao *riboswitch xpt* ocasionando mudança estrutural e a regulação negativa do operon. O sRNA quando comparado ao controle não apresentou efeito e pode ser devido à degradação rápida dentro da célula por RNases específicas de *B. subtilis* (Figura 24 A e B).

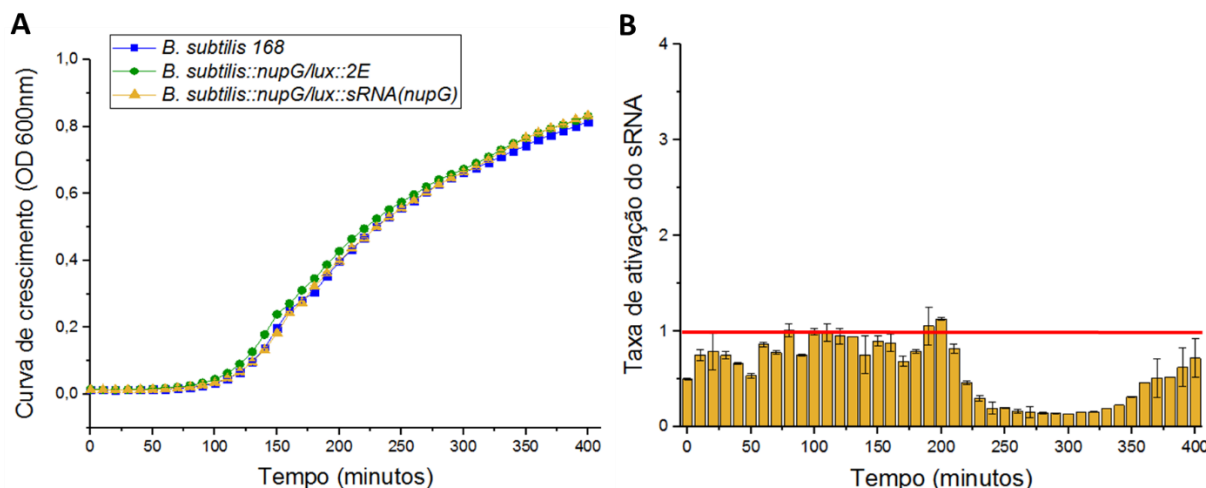
Figura 24- A: Curva de crescimento (OD 600 nm versus tempo em minutos) de *B. subtilis* 168 selvagem, *B. subtilis::xpt/luxABCDE::2E* sem o sRNA (controle) e *B. subtilis* reprogramado com o sRNA específico *B. subtilis::xpt/luxABCDE::sRNA(xpt)*. **B:** Taxa de ativação da expressão gênica causada pelo 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.



Fonte: o autor.

O sRNA(*nupG*) também não apresentou efeito sobre o *riboswitch nupG*, visto que a linhagem que expressa este sRNA apresentou níveis de bioluminescência iguais ou, por vezes, menores que o controle durante o crescimento. Neste caso, sugere-se que, mesmo com o sRNA presente na célula, este não foi capaz de se hibridizar ao aptâmero, talvez por não apresentar estabilidade quando transcrito intracelularmente (Figura 25A e B).

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.



Fonte: o autor.

Dentre os sRNAs testados *in vivo*, apenas aqueles contra o *riboswitch purE* e *pbuE* apresentaram excelente atividade sem modificações. Os sRNAs contra os *riboswitches nupG* e *xpt* apresentaram atividade inicial muito baixas, provavelmente devido à degradação por RNases intracelulares.

Para avaliar a transcrição e estabilidade do sRNA na célula, além da inserção de sequência estabilizadora, foi escolhido como modelo o sRNA(*purE*), que foi funcional após crescimento e avaliação da regulação do operon da bioluminescência, para confirmar esta nova tecnologia de pequenos RNAs sintéticos como reprogramadores de metabolismos, sendo os resultados apresentados no item 5.4.

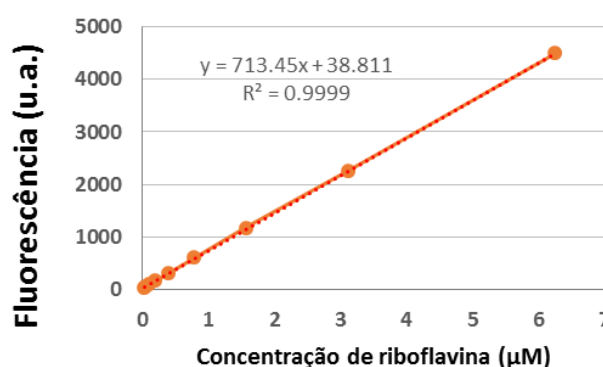
5.5.5 Ensaios *in vivo* do sRNA desenhado para o *riboswitch ribDG*

Para avaliar a capacidade do sRNA em produzir riboflavina, a linhagem contendo apenas o sRNA(*ribDG*) sem o operon *luxABCDE* foi construída para quantificar a riboflavina através de medições de fluorescência. Uma linhagem controle contendo um sRNA inespecífico (nesse caso o sRNA desenhado para o *riboswitch purE*) foi gerada para verificar se não ocorreria reação cruzada.

Além disto, este sistema foi utilizado para confirmar que sRNAs sintéticos podem ser facilmente projetados e sintetizados independente de sua estrutura secundária, afinal, este *riboswitch* se difere dos de purina por ter arcabouço mais complexo, com cinco *loops*.

Após análises de fluorescência com concentrações conhecidas de riboflavina comercial, foi calculada a curva padrão e assim obtida a equação da reta e o R^2 para estimar a produção da riboflavina pelas bactérias reprogramadas (Figura 26).

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.



Fonte: o autor.

B. subtilis::sRNA(ribDG) apresentou níveis de fluorescência maiores que o controle sem o sRNA e com o sRNA(*purE*). Este último foi utilizado como controle para garantir que outro sRNA sintético de mesmo tamanho não iria interferir com reação cruzada na regulação causada pelo *riboswitch ribDG*.

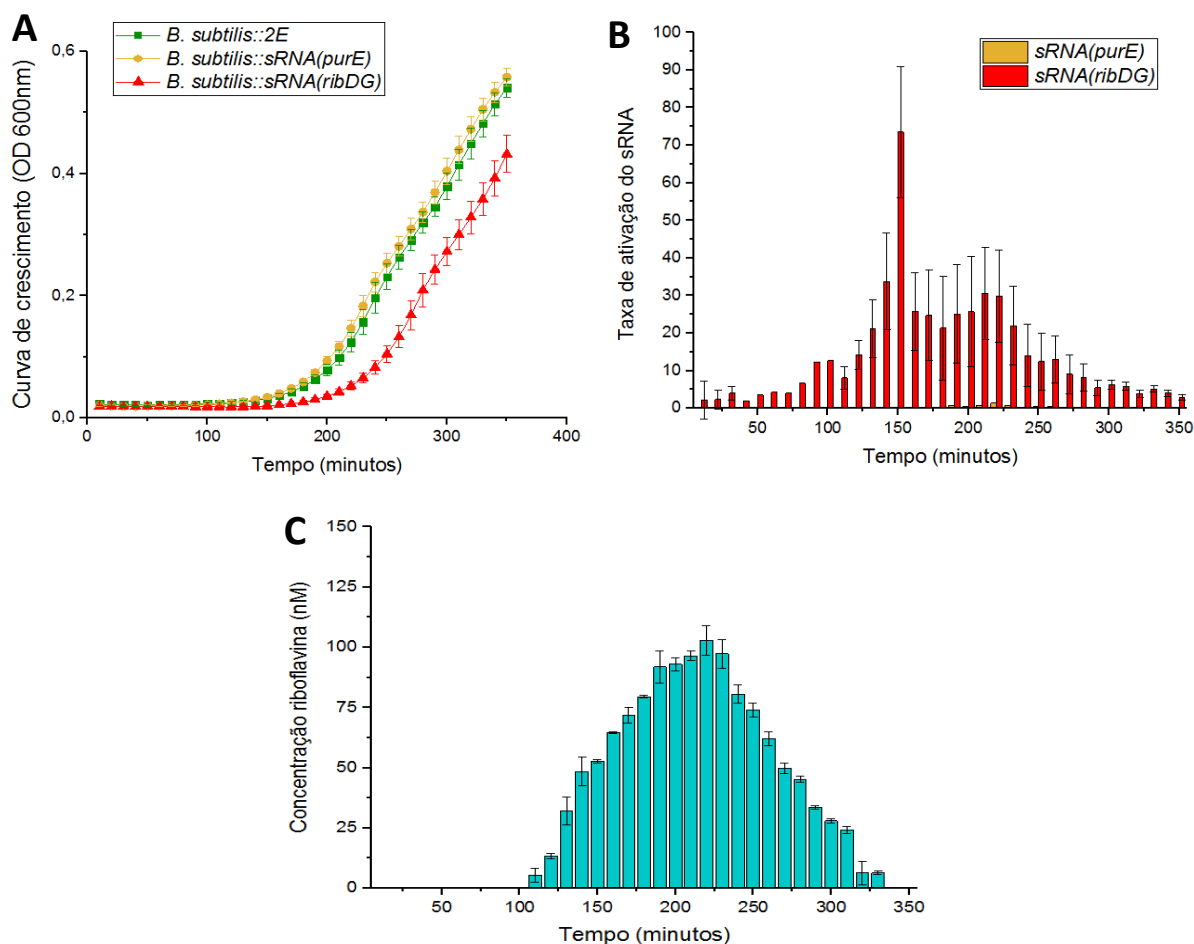
O sRNA desenhado para o *ribDG* demonstrou funcionalidade quando comparado ao controle sem sRNA e ao sRNA(*purE*). O crescimento deste clone foi um pouco mais lento devido provavelmente à produção aumentada de algum metabólito, e isto pode indicar a produção da riboflavina (Figura 27A). Além disto, o sRNA(*ribDG*) apresentou efeito no início da fase log com aumento de 70 vezes da expressão do operon da riboflavina. O sRNA(*purE*) não apresentou funcionalidade quando medida à fluorescência para avaliar a produção da riboflavina, sugerindo que não houve reação cruzada e o sRNA (*ribDG*) é altamente específico em se ligar ao *riboswitch* e interferir na regulação (Figura 27B).

Quando comparados os níveis de fluorescência com a curva-padrão, foi possível estimar o quanto de riboflavina a linhagem reprogramada com sRNA(*ribDG*) produziu. A produção máxima ocorreu aos 220 minutos de cultivo com pouco mais de 100 nM (Figura

27C). Vale lembrar que a linhagem usada possui apenas uma cópia genômica do operon da riboflavina sem qualquer das alterações conhecidas que levam a alta produção da vitamina.

Neste estudo foi possível observar mais diretamente o efeito de um sRNA sintético na produção de um metabólito com interesse industrial. Sugere-se que os sRNAs são capazes de alterar uma via metabólica impedindo a ação de riborreguladores, e foi possível observar este efeito mesmo estando em cópia única no genoma de *B. subtilis*.

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*).



Fonte: o autor.

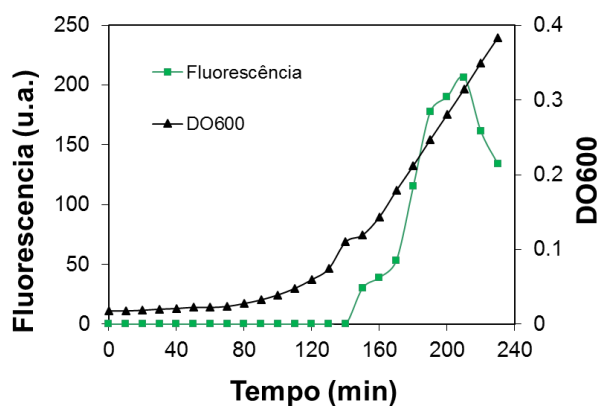
5.6 Modelo funcional de sRNA(*purE*) para reprogramação do metabolismo de purinas em *Bacillus subtilis*

5.6.1 Estabilidade do sRNA(*purE*) transcrito na célula

Para confirmar que o sRNA(*purE*) está sendo transcrito na célula do *B. subtilis* e que sua função de impedir a regulação do *riboswitch* no operon da bioluminescência é devido à sua síntese e permanência na célula, foi desenvolvida uma metodologia para avaliar em tempo real a produção dos sRNAs sintéticos *in vivo*.

A linhagem *B. subtilis*::sRNA(*purE*)-RNA-Broccoli foi construída. A utilização do RNA-Broccoli, que é capaz de se ligar a um fluoróforo mimetizando a GFP, permitiu o monitoramento em tempo real da transcrição e da estabilidade do sRNA. A figura 28 demonstra a curva de crescimento do *B. subtilis*::sRNA(*purE*)-RNA-Broccoli cultivado em microplaca em meio definido. Aos 130 minutos, na fase logarítmica inicial, foi adicionado IPTG, para iniciar a expressão do sRNA, e o fluoróforo DFHBI. Após 20 minutos de indução, é possível detectar a transcrição do sRNA com o aumento da fluorescência atingindo o valor máximo após 80 min de indução. Como a degradação do fluoróforo DFHBI inicia-se cerca de 90 min após a sua adição, não foi possível avaliar por tempo prolongado a expressão do RNA-Broccoli. Ainda assim, foi suficiente para constatar a capacidade de *B. subtilis* em sintetizar os sRNAs sintéticos.

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.



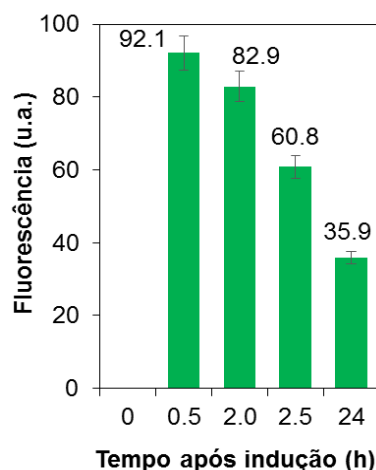
Fonte: o autor.

Foi realizado um outro experimento em paralelo, com o crescimento de *B. subtilis*::*Pgrac*-sRNA(*purE*)-RNA-Broccoli em frascos erlenmeyers, utilizando mesa

agitadora e crescimento em meio definido com volume e aeração maiores, para comparação com os dados obtidos no microcultivo. Após indução por IPTG, foram realizadas coletas das células. Em cada ponto de leitura, as células foram incubadas com DFHBI por 10 min, a 37°C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em solução salina e quantificadas quanto à fluorescência. Com a adição de DFHBI apenas nas leituras, evitou-se o problema anteriormente observado de degradação do fluoróforo durante o crescimento bacteriano.

Na figura 29 é possível observar a expressão por tempo mais longo em relação ao cultivo em microplaca. Foi verificado que a expressão persiste por até 24h, com diminuição no acúmulo de RNA com o envelhecimento da cultura.

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.



Fonte: o autor.

5.6.2 RiboJ como sequência não-traduzida e estabilizadora do sRNA(*purE*)

A ferramenta genética RiboJ é uma ribozima que promove autoclivagem de regiões 5' UTR de mRNAs, proporcionando estabilidade ao RNA devido à sua estrutura secundária em *hairpin* (LOU et al., 2012). Esta ferramenta foi aqui utilizada para melhorar a estabilidade dos sRNAs na célula, e, conseqüentemente, sua eficiência em interferir na regulação causada pelos *riboswitches*.

Antes de fusionar a sequência da RiboJ ao sRNA e para garantir a hibridização entre o complexo RiboJ-sRNA(*purE*) com o *riboswitch*, foram realizadas análises *in silico* para

garantir a preservação da capacidade do sRNA sintético de hidridizar com o alvo. A sequência da RiboJ está descrita na tabela 6.

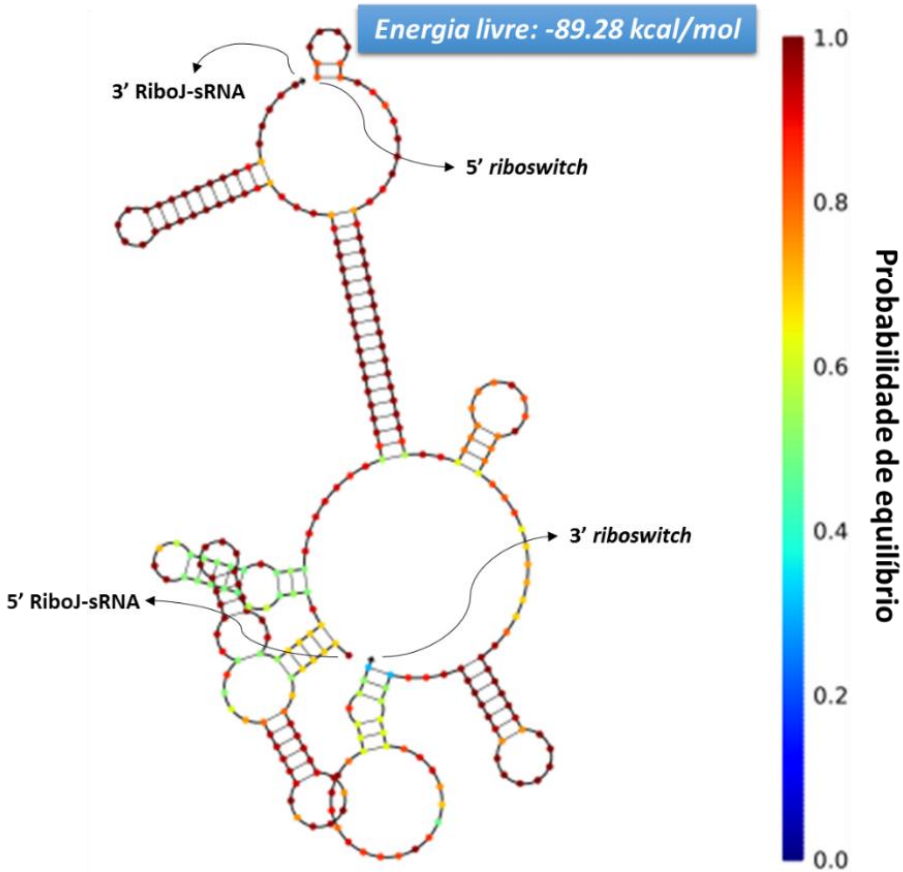
Tabela 6- Sequência da RiboJ a qual foi fusionada com o sRNA desenhado para interferir na regulação do *riboswitch* de guanina *purE*;

	Sequência 5'-3'
RiboJ	AGCTGTC ACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAA CAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAA
Legendas	: sítio de clivagem; <i>vermelho</i> : core catalítico; <i>azul</i> : loops; <u>sublinhado</u> : hairpin-3'.

Fonte: Nielsen et al. (2016).

Os resultados das simulações da sequência RiboJ-sRNA(*purE*) sugerem que a hibridização entre o complexo não interfere na interação entre o sRNA e o *riboswitch purE*, e, portanto, seria viável fusionar RiboJ à sequência do sRNA(*purE*) (Figura 30).

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.



Fonte: o autor.

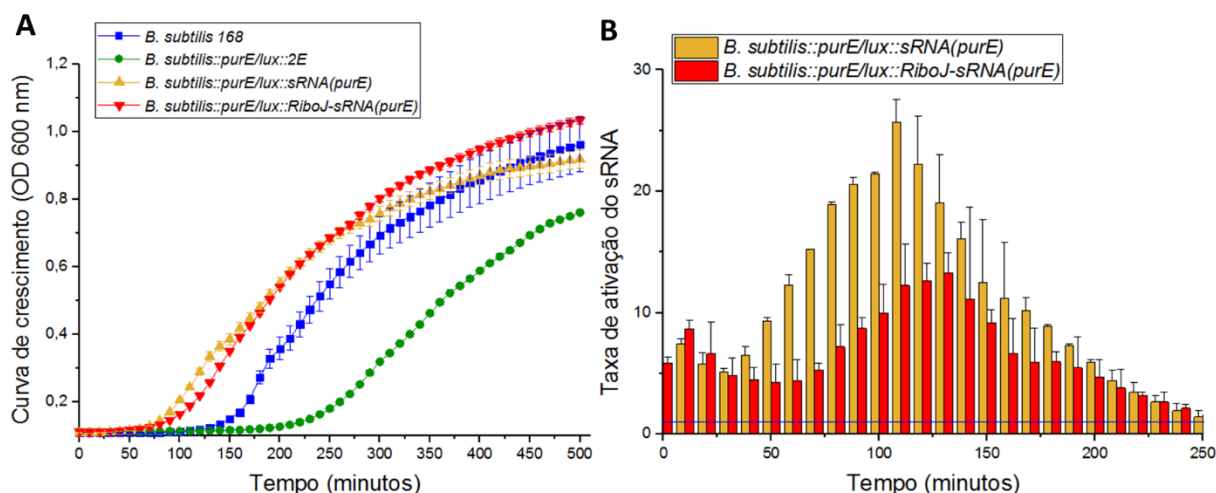
Microcultivos foram realizados para confirmar a funcionalidade do sistema RiboJ-sRNA(*purE*) frente ao *riboswitch purE*. Foi observado que *B. subtilis* sem o sRNA (*B. subtilis::purE/luxABCDE::2E*) cresceu mais lentamente, provavelmente devido à sobrecarga metabólica gerada pela expressão heteróloga do operon *lux*.

Uma característica interessante é que as bactérias reprogramadas, ao contrário do esperado, apresentaram densidade populacional maior e cresceram mais rapidamente que o selvagem do tipo *B. subtilis* 168. *B. subtilis* reprogramados com RiboJ-sRNA(*purE*) e com sRNA(*purE*), cresceram mais rapidamente apresentando fase *lag* reduzida, indicando que o sRNA sintético não é tóxico para a célula, sendo uma característica importante para bateladas industriais na produção de metabólitos (Figura 31A). Os dados de *B. subtilis* com o sRNA(*purE*) se confirmam com os obtidos anteriormente apresentados na figura 22.

A taxa de ativação do sRNA foi calculada em relação ao controle e observado que *B. subtilis* reprogramado com o sRNA(*purE*) apresentou maior taxa de ativação aos 110 minutos de cultivo (fase logarítmica) com aumento da bioluminescência em até 25 vezes em relação ao controle sem sRNA. *B. subtilis::RiboJ-sRNA(purE)* também foi ativo na fase *log* de crescimento apresentando aumento aproximadamente 15 vezes nos níveis de bioluminescência (Figura 31B).

A diferença dos níveis de ativação entre o sRNA(*purE*) e fusionado à RiboJ pode ser devido à capacidade da RiboJ em isolar o contexto genético de fatores ambientais. No gráfico 31 B, observa-se que os níveis da taxa de ativação da RiboJ-sRNA(*purE*) são semelhantes durante todo o cultivo, obtendo menor variação de taxa em relação ao sRNA não-fusionado. Esta característica pode ser devido ao aumento da estabilidade do sRNA transcrito na célula.

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.



Fonte: o autor.

A RiboJ diminuiu a ativação do sRNA(*purE*) quando fusionada, entretanto, ainda assim aumentou em 10 vezes a taxa de bioluminescência em relação ao controle demonstrando sua funcionalidade. Neste caso, foi possível a construção de dois sistemas de riborregulação com níveis de regulação diferentes, permitindo ampliar a aplicação destas ferramentas.

5.6.3 Scale-up de *B. subtilis* reprogramado com RiboJ-sRNA(*purE*)

O cultivo em volume maior foi realizado para avaliar se o comportamento das bactérias reprogramadas seria compatível com o microcultivo, como um passo em direção ao aumento de escala para cultivo em dornas de fermentação.

Portanto, foi decidido aumentar a escala realizando cultivos em frascos erlenmeyers com *B. subtilis::purE/luxABCDE::RiboJ-sRNA(purE)* e os respectivos controles para confirmar a funcionalidade deste sistema. As condições de cultivo foram semelhantes ao microcultivo utilizando meio LB sem adição de guanina e temperatura 37°C, observando a densidade óptica e bioluminescência até a fase estacionária.

Um novo controle foi construído para avaliar se haveria efeito cruzado da RiboJ-sRNA(*purE*) com outro *riboswitch xpt*, o qual também regula o gene em resposta à

concentração de guanina. *B. subtilis::xpt/luxABCDE::RiboJ/sRNA(purE)* cresceu semelhante a *B. subtilis* com o sRNA(*purE*) indicando que mesmo com a produção do sRNA sintético, este não apresentou toxicidade para a célula. Além disso, foi observado o quão específico o sistema RiboJ-sRNA(*purE*) é em interromper apenas a regulação do *riboswitch purE*, pois não foi observada ativação da bioluminescência quando testado frente ao *riboswitch xpt* (Figura 32A e B).

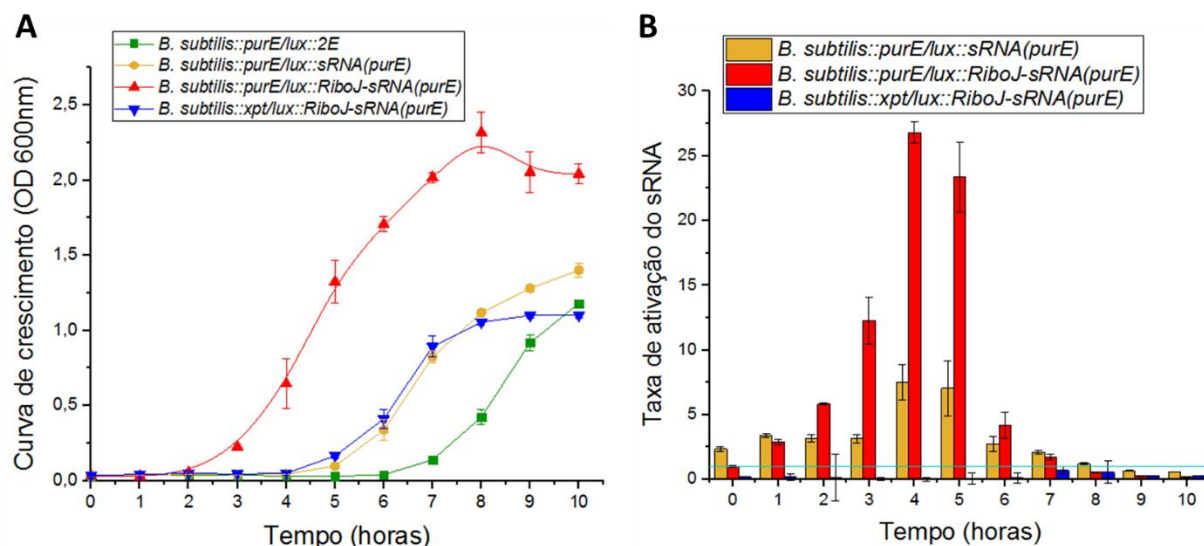
B. subtilis::purE/lux::sRNA(purE), sem a sequência insuladora, cresceu semelhantemente aos controles e apresentou efeito na interrupção da regulação do *riboswitch purE* maior que cinco vezes no início da fase log. Isto indica que o sRNA por si só já é capaz de impedir a regulação do operon *luxABCDE* aumentando os níveis de bioluminescência. Estes dados corroboram com os obtidos em microcultivo confirmando que o aumento de escala não interferiu no resultado final desejado (Figura 32A e B).

B. subtilis::purE/luxABCDE::RiboJ/sRNA(purE) apresentou crescimento bem melhor em relação ao tipo selvagem e ao novo controle. Pode-se apontar que houve acúmulo de guanina endógena facilitando o metabolismo primário da linhagem e consequentemente o crescimento. Esta característica não era esperada nos experimentos, pois poderia ocorrer estresse metabólico para a célula reprogramada ao transcrever um RNA não-natural. Entretanto, esta bactéria reprogramada apresenta saída da fase lag adiantada e maior densidade óptica após o cultivo, apresentando características importantes quando observados os critérios dos microrganismos para serem utilizados na produção de produtos biotecnológicos (Figura 32A).

Além do ótimo crescimento populacional, *B. subtilis::purE/luxABCDE::RiboJ-sRNA(purE)* apresentou um aumento significativo de luminescência, maior que 25 vezes, em relação ao controle sem sRNA. O pico de bioluminescência se deu entre 3 e 5 horas de crescimento, durante a fase exponencial. Em comparação com o microcultivo, o aumento de escala não interferiu no crescimento, saindo rapidamente da fase de adaptação, e ao final do cultivo apresentou densidade populacional similar. Relacionando a bioluminescência, o sistema RiboJ-sRNA(*purE*) obteve efeito tanto em microcultivo quanto em larga escala, comprovando sua eficiência em impedir a riborregulação do *riboswitch purE* (Figura 32B).

Portanto, o aumento de escala é importante e se faz necessário para avaliar como linhagens reprogramadas se comportam num ambiente mais similar ao de fermentações industriais para sua futura aplicação na produção de compostos biotecnológicos. A linhagem contendo o sistema RiboJ-sRNA(*purE*) se adaptou melhor às condições de *scale-up* neste experimento.

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.



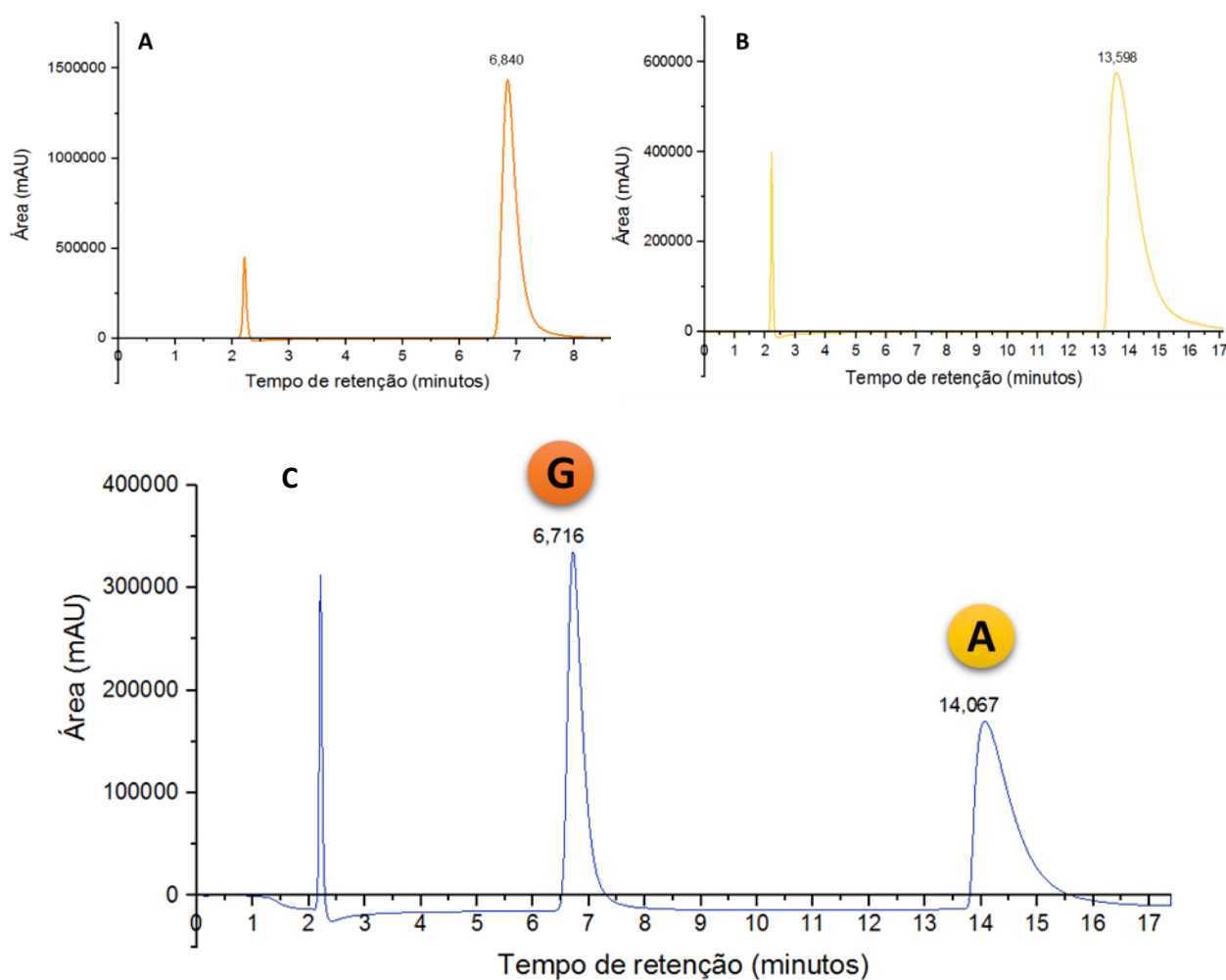
Fonte: o autor.

5.6.4 Quantificação de guanina e adenina produzidas pelas linhagens de *B. subtilis* reprogramadas com sRNA(*purE*) e RiboJ-sRNA(*purE*) por Cromatografia Líquida de Alta Performance HPLC

5.6.4.1 Calibração do método para quantificação de purinas

Inicialmente, foram injetadas amostras de guanina e adenina separadamente para obtenção do tempo de retenção de cada purina. Na figura 33, observa-se que as purinas apresentam tempos de retenção distintos, com picos e áreas bem definidos. Portanto, foi decidido realizar as curvas-padrão injetando-se solução com ambas as purinas, sendo possível a separação total em tempos de retenção diferentes, tornando-se um método eficaz para avaliar quantidade de purinas em amostras purificadas de lisado celular de *B. subtilis*.

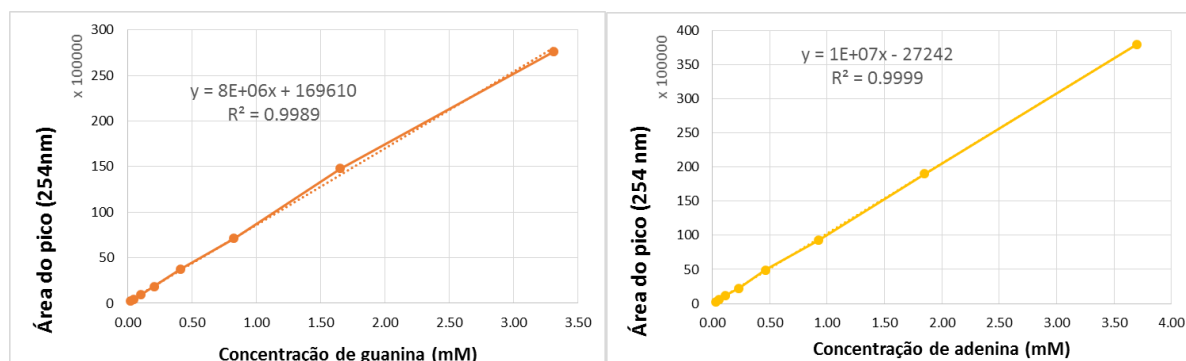
Figura 33- A: Cromatograma da solução contendo a guanina em concentração de 3,7 mM, com o tempo de retenção 6,840 minutos; **B:** Cromatograma da solução contendo adenina em concentração de 3,3 mM, com o tempo de retenção 13,598 minutos. **C:** Cromatograma da solução contendo a guanina (G) e adenina (A) em concentração de 0,92 e 0,82 μ M 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.



Fonte: o autor.

As curvas padrão das purinas, guanina e adenina, foram configuradas medindo-se as áreas do cromatograma de cada concentração, que variou de 0,025 a 3,7 mM (Figura 34). A equação da reta foi calculada e o R^2 de cada foi condizente para predizer as concentrações de purinas das amostras analisadas.

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.



Fonte: o autor.

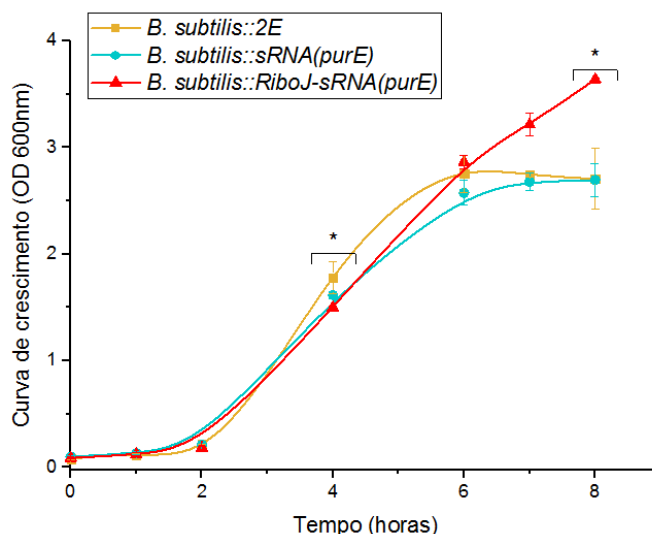
5.6.3.2 Quantificação de guanina e adenina intracelular das linhagens reprogramadas

O objetivo central deste estudo foi reprogramar o metabolismo de purinas utilizando sRNAs sintéticos para interrupção da regulação causada pelos *riboswitches*. Para confirmação da funcionalidade, após testes *in vivo*, foram quantificadas a guanina e adenina no intuito de observar o aumento intracelular, confirmando a aplicação desta nova ferramenta genética para reprogramar metabolismos.

Foram realizadas duas coletas em diferentes fases do crescimento microbiano: uma na fase logarítmica e uma na fase estacionária para comparar as concentrações de guanina e adenina em diferentes densidades ópticas. As células foram coletadas durante 4, 6, 7 e 8 horas de cultivo de cada bactéria. Para injetar as amostras no HPLC, as amostras foram normalizadas pela densidade óptica durante o preparo com tampão PBS (0,1M), para posteriormente quantificar as purinas utilizando o valor das áreas dos picos e calculadas as concentrações de acordo com as retas-padrão.

B. subtilis contendo o sistema RiboJ-sRNA(*purE*) atinge uma densidade populacional maior quando comparada ao controle negativo sem o sRNA e à linhagem *B. subtilis*::sRNA(*purE*), sendo aparentemente mais robusta (Figura 35).

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.



Fonte: o autor.

Implementou-se um método de separação adequado para as purinas e estimou-se os níveis de produção das bactérias reprogramadas. A guanina é eluída mais rapidamente na coluna com a fase móvel utilizando a coluna C18 hypersil, apresentando tempo de retenção entre 6 e 7 minutos, e a adenina apresentou tempo de retenção maior entre 14 e 14,5 minutos.

Quantificou-se guanina e adenina de *B. subtilis*::sRNA(*purE*) e do sistema RiboJ-sRNA(*purE*) conforme previsto no método padronizado neste estudo. As concentrações de guanina e adenina produzidas pelas bactérias reprogramadas foram comparadas ao controle sem o sRNA e foi calculado o aumento da produção de purinas em percentual após aplicação dos valores das áreas dos cromatogramas nas equações de reta.

Em relação à produção de guanina, foi observado que, no final da fase logarítmica, *B. subtilis* reprogramado com sRNA(*purE*) é capaz de manter intracelularmente a guanina aumentando em 60% o pool desta purina na célula, demonstrando que o sRNA foi capaz de neutralizar o efeito de regulação negativa causada pelo *riboswitch purE*. Nitidamente, conforme a densidade populacional foi aumentando, os níveis de guanina apresentaram aumento e assim permaneceu estável na fase estacionária (Figura 36A).

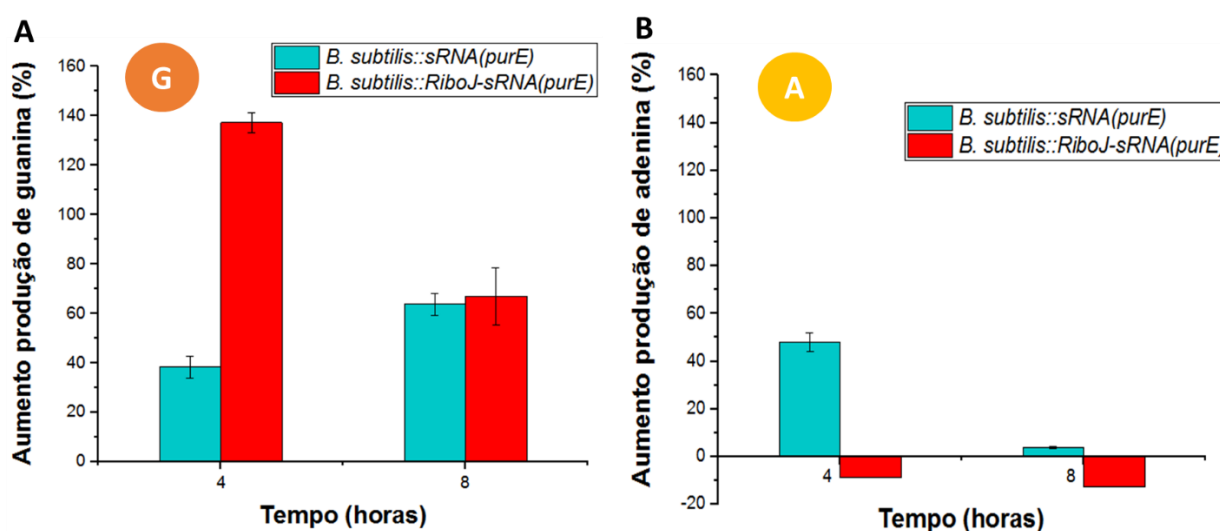
B. subtilis com o sistema RiboJ-sRNA(*purE*) demonstrou esta característica de produzir e estocar a guanina intracelular, similar ao sistema só com o sRNA(*purE*) (Figura 36A). As bactérias reprogramadas com RiboJ-sRNA(*purE*) e *B. subtilis*::sRNA(*purE*) apresentaram nível de guanina intracelular maior que o controle sem o sRNA, como o

esperado, apresentando um *pool* intracelular na fase estacionária. Os sRNAs, com ou sem a RiboJ na extremidade 5' UTR, neutralizaram o efeito do *riboswitch* na regulação do operon da bioluminescência mesmo em altas concentrações de guanina dentro da célula.

Este aumento de guanina intracelular das linhagens reprogramadas, pode confirmar o que foi observado após curva de crescimento. A guanina intracelular pode ter favorecido o desenvolvimento do metabolismo primário do microrganismo fazendo com que responsável pelo

Além disto, para avaliar o quanto a regulação causada pelo *riboswitch* sofreria interferência pelo sRNA(*purE*), foi calculado o quanto de adenina é retida na célula de *B. subtilis* reprogramados. Foi observado que a produção de adenina foi bem semelhante entre os microrganismos e o controle sem o sRNA, não sendo aparentemente afetada na presença do sistema de RNA sintético (Figura 36B).

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.



Fonte: o autor.

Este resultado corrobora com as funções dos *riboswitches* na regulação do genes do metabolismo de purinas. O *riboswitch purE* que regula o operon *pur* é sensível apenas à concentração intracelular da guanina, e quando esta atinge um limiar na célula, a regulação do *riboswitch* é acionada pela ligação da guanina na região do aptâmero, causando uma mudança conformacional e interrupção da expressão do operon. Este *riboswitch* não se liga à adenina,

pois possui um único nucleotídeo que por pareamento Watson-Crick se liga de maneira específica à guanina.

O sRNA(*purE*), com ou sem a sequência insuladora, demonstrou ser funcional em reprogramar o metabolismo de purina, mas especificamente impedindo a regulação causada pelo *riboswitch* que regula o operon da síntese *de novo*. O uso de destes sRNAs sintéticos como riborreguladores é interessante para aplicação na produção de vários metabólitos com interesse industrial, por exemplo na síntese de riboflavina, onde o GTP formado nesta via é utilizado como precursor.

6 DISCUSSÃO

O metabolismo de purinas foi escolhido em nosso trabalho por gerar moléculas de alto valor biotecnológico (por exemplo adenosina, inosina, hipoxantina), além de conectar-se a outras importantes vias metabólicas essenciais, como metabolismo de aminoácidos, a via das pentoses, glicólise, biossíntese de nucleotídeos e biossíntese de vitaminas como a riboflavina.

A opção por utilizar sRNAs sintéticos sobre as técnicas comumente empregadas para reprogramar o metabolismo, como deleções e seleção de mutantes resistentes a antimetabólitos, baseou-se na possibilidade de manipular uma via metabólica essencial para o organismo sem reduzir sua velocidade de crescimento, ou levá-lo à morte. Estas características são importantes para o processo industrial de metabólitos a partir de cultivo de microrganismos, pois diminui os custos associados à produção.

Em relação à escolha da bactéria, *B. subtilis* é interessante para os processos industriais. Comparando esta bactéria com outros microrganismos procarióticos ou eucarióticos, *B. subtilis* é conhecida por secretar grandes quantidades de proteínas, além de utilizar fontes baratas de carbono em fermentações industriais de produtos biotecnológicos (GU et al., 2018).

Em *B. subtilis*, a regulação de genes e operons desta via acontece pela aplicação de *riboswitches*. Cada classe de *riboswitch* possui sequência de aptâmero e estrutura tridimensional dos nucleotídeos distintas, e, geralmente, são sequências altamente conservadas entre famílias de microrganismos que contêm esse sistema de regulação. Os *riboswitches* de adenina assim como os de guanina possuem conformação similares, ou seja, suas estruturas secundárias são parecidas (SERGANOV et al., 2004; PORTER et al., 2014).

Os aptâmeros dos *riboswitches* possuem regiões conservadas e se ligam de maneira específica ou com guanina ou com a adenina, sendo apenas um nucleotídeo que confere a característica de ligação. Entretanto, alguns análogos a estes metabólitos podem se ligar gerando respostas em nível menor (NYGAARD; SAXILD, 2005).

Inicialmente, as reações *in vitro* foram realizadas para caracterização dos *riboswitches* objetivando confirmar qual metabólito iria se ligar de maneira específica, possibilitando a alteração estrutural e o controle da expressão gênica do gene *luc*. Portanto, a ideia em realizar no primeiro momento as análises *in vitro* antes de partir para as células de *B. subtilis* foi o melhor controle das reações com concentrações definidas dos ligantes para, após a produção de luciferase, caracterizá-los.

O comportamento dos *riboswitches* de purinas na presença dos ligantes não tinha sido observado anteriormente, apenas alguns experimentos para avaliar a estrutura primária e secundária dos mesmos, assim como a cinética de ligação do ligante ao aptâmero (WICKISER et al., 2005; HU; MA; WANG, 2017). O *riboswitch ribDG*, que responde às concentrações intracelulares de FMN, já estava descrito na literatura como terminador da transcrição prematura do operon para produção da riboflavina após algumas análises *in vitro*. FMN, quando atinge níveis elevados intracelular, consegue se ligar de maneira específica ao *riboswitch*, levando à formação de um terminador dentro da plataforma de expressão (PEDROLI et al., 2015; MATERN et al., 2016).

Nesta pesquisa, foi desenvolvido um método eficiente para caracterizar *riboswitches* de purinas, os quais não tinham sido descritos na literatura até o momento. Mesmo assim, os dados da caracterização *in vitro* dos *riboswitches* correspondem ao papel riborregulador que exercem no metabolismo, e, portanto, este método é eficaz e pode ser aplicado para avaliar a riborregulação de outros sistemas.

Experimentos para estabilidade e funcionalidade *in vivo* foram importantes para confirmar a regulação que os *riboswitches* realizam na presença e ausência dos ligantes no contexto genético da bactéria *B. subtilis*. Uma vez que as purinas são importantes para o metabolismo primário de microrganismos e podem ser metabolizadas durante a fase log de crescimento, foi importante a caracterização da resposta dos *riboswitches in vivo* para confirmar o mesmo padrão de regulação da caracterização *in vitro*.

O efeito da regulação causada pelos *riboswitches* foi exemplarmente visualizado quando submetidos *upstream* ao operon da bioluminescência, sendo uma confirmação de como atuam na regulação dos operons e genes que fazem parte do metabolismo de purinas. Os dados brutos da bioluminescência foram facilmente obtidos e assim comparados com os da bactéria controle sem a presença do riborregulador. Isto indica mais uma vez que o modelo proposto do sistema *riboswitch/luxABCDE* funcionou para avaliar *in vivo* o papel riborregulador na presença dos ligantes.

Neste estudo, foi escolhido reprogramar o metabolismo de purinas em *B. subtilis*, focando nos genes que sofrem riborregulação. Softwares foram bem empregados para o design computacional dos sRNAs e se avaliou o comportamento, bem como estrutura secundária pela probabilidade de *base-pairing*, de cada sRNA quando hibridizado ao *riboswitch* correspondente.

Para construção dos pequenos RNAs sintéticos, dois softwares foram utilizados com o intuito de projetar e simular a interação entre os *riboswitches* com os sRNAs. O Ribomaker é

uma ferramenta de desenho de RNAs regulador que adapta técnicas de deslocamento de fita derivadas da nanotecnologia combinadas com computação evolutiva, executando computação evolucionária entre duas moléculas de RNAs (RODRIGO; JARAMILLO, 2014). O NUPACK gera dados como a probabilidade de cada base do sRNA conseguir parear com o *riboswitch* em uma solução em equilíbrio, prevendo a interferência na estrutura como também o conteúdo de GC, o MFE (Energia livre mínima), entre outras informações (ZADEH et al., 2010).

Observou-se que os sRNAs gerados pelo Ribomaker, os quais foram desenhados para ligação complementar aos *riboswitches* de purinas e FMN, foram capazes de interromper a regulação dos *riboswitches* no gene *luc* após expressão gênica *in vitro*, indicando que as condições de *input* inseridas no software, as interações intra e intermoleculares e a *seed site* escolhida, foram cruciais para o design e funcionalidade dos sRNAs.

Os sRNAs funcionam bloqueando *in vitro* o correto enovelamento dos aptâmeros provocando mudança na conformação espacial da plataforma de expressão, e, assim, promovendo a transcrição integral do gene *luc*, mesmo na presença de alta concentração de guanina/FMN (*riboswitches* dos operons *pur*, *xpt-pbuX* e *ribDG* e o gene *nupG*), e, ainda, houve terminação prematura da transcrição do *luc* mesmo na presença de alta concentração de adenina, no caso no *riboswitch pbuE*.

As linhagens de *B. subtilis* contendo o sistema *riboswitch*-sRNA foram avaliadas *in vivo* para confirmar a funcionalidade dos sRNAs na interferência da regulação gênica que os *riboswitches* exercem. Foi observado que os sRNAs sintéticos foram funcionais quando transcritos em células de *Bacillus subtilis*, indicando que a tecnologia de projetar uma fita de RNA com efeito riborregulador é possível. Algumas medidas, como a fusão da sequência RiboJ, foram adotadas para aumentar a estabilidade na célula dos sRNAs que aparentemente não tiveram efeito ou não foi possível observar.

Para ratificar o uso de pequenos RNAs como ferramenta em alterar o metabolismo microbiano e deslocar para produção de metabólitos com interesse industrial, foi pensada a construção do sRNA(*ribDG*) para impedir a regulação negativa do operon que codifica a riboflavina. As linhagens e os controles foram obtidos, e assim, foi possível quantificar a riboflavina produzida confirmando o emprego de um sRNA sintético como reprogramador de um metabolismo com importância biotecnológica.

A quantidade de RNA transcrito em uma célula varia de acordo com as taxas de transcrição e degradação (*RNA turnover*). Portanto, naturalmente os RNAs tem tempo de meia vida muito baixo sendo degradados por RNases, enzimas que também são usadas como um

mecanismo para regulação da expressão gênica (CASCANTE-ESTEPA; GUNKA; STÜLKE, 2016). A inserção de sequências com estruturas secundárias complexas nas extremidades dos RNAs são comuns em microrganismos, aumentando a estabilidade por tempo maior na célula e evitando a degradação por RNAses específicas (CONDON, 2003).

Sugere-se que os sRNAs que não foram funcionais podem ter sido facilmente degradados por RNAses por não terem estrutura secundária protegendo o arcabouço, além de serem pequenos. Na tentativa de aumentar a estabilidade de um RNA, sequências com estrutura secundária em forma de *hairpin* foram caracterizados na literatura para garantir uma maior estabilidade quando produzida na célula (NIELSEN et al., 2016). Elas foram descritas como sequências ‘insuladoras’, as quais, mesmo mudando o ambiente genético (por exemplo, promotor ou terminador), a expressão do gene seria similar entre as condições simuladas.

A intenção ao fusionar a RiboJ às extremidades 5’ dos sRNAs foi aumentar a estabilidade dos mesmos. Após os testes *in vivo* com os complexos *riboswitches*-sRNAs, foi observado que as sequências dos sRNAs sozinhos tem efeito na regulação do operon da bioluminescência aumentando sua expressão na célula, entretanto, aparentemente foram degradados em maior velocidade que sua expressão. Com a introdução do sistema RiboJ-sRNA(*purE*) ao *B. subtilis*, é observado que o tempo o qual o sinal da bioluminescência é captado é maior, intensificando consideravelmente a expressão.

Sugere-se que, pela maior estabilidade estrutural do sRNA, a funcionalidade do sRNA(*purE*) foi aumentada quando fusionada à RiboJ e este sistema se hibridizou com o respectivo *riboswitch* causando interrupção deste na regulação. Após as análises em HPLC, foi confirmada que é possível aplicar a tecnologia de pequenos RNAs sintéticos para reprogramar o metabolismo de purinas em linhagens de *B. subtilis*.

A fusão do sRNA (*purE*) com a ribozima RiboJ estabilizou a molécula e tornou o sRNA altamente funcional. Assim, a RiboJ pode ser aplicada nos outros sistemas com os sRNAs sintéticos. Existem fatores celulares que dificultam a ação dos sRNAs *in vivo*, como o fato de estarem em cópia única no genoma. Soluções podem ser adotadas para funcionalizar os outros sRNAs sintetizados em nosso estudo, assim como foi possível com os sRNAs *pbuE* e *purE* *in vivo*. A inserção de sequência na extremidade 5’ UTR dos sRNAs é uma possibilidade em oferecer estabilidade e funcionalidade ao sistema.

Além disso, o fato da RiboJ ter auxiliado no funcionamento do sRNA, permite a construção de operons de sRNA para controlar vários alvos simultaneamente, também facilitando a construção de uma linhagem industrial. Pensando em um sistema completo contendo todos os sRNAs, a inserção das RiboJs *upstream* a cada sRNA pode facilitar o

correto enovelamento e separação dos sRNAs após transcrição, assim como, aumentar o tempo de vida na célula. Quando estas sequências insuladoras são usadas em circuitos genéticos sintéticos, o comportamento pode ser previsto (LOU et al., 2012).

Esta organização ocorre naturalmente no genoma de procariotos com RNAs que não codificam proteínas, como por exemplo, clusters de tRNAs que são separados quando transcritos e promovem diferentes funções na célula (CHEN; YANOFS, 2003; MORGADO; VICENTE, 2018).

Portanto, uma linhagem industrial de *B. subtilis* programada para aumentar a produção de purinas durante a fase exponencial de crescimento carregando o operon com os sRNAs sintéticos é viável e aplicável. Esta linhagem também poderia ser programada para aumentar a produção de riboflavina (vitamina B₂), dando vazão ao excesso de purinas (mais especificamente GTP) produzido pela reprogramação do metabolismo, durante a fase exponencial de crescimento.

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* reprogramado 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.

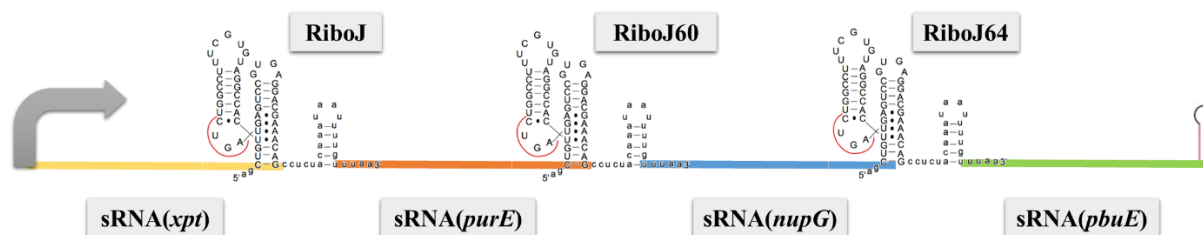
O modelo de controle do fluxo metabólico proposto neste trabalho poderá ser futuramente útil no desenvolvimento de linhagens na produção de outras substâncias de interesse biotecnológico, derivadas do metabolismo primário de *B. subtilis*, como a riboflavina.

8 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

A sequência estabilizadora da RiboJ tem potencial quando fusionada ao sRNA(*purE*) aumentando sua estabilidade na célula. Além disto, ela funciona como uma ribozima autocatalítica. Pode-se sugerir que, fusioná-la aos outros sRNAs projetados neste estudo (*nupG* e *xpt*), garanta funcionalidade aos mesmos.

Além disso, pensando numa linhagem final industrial contendo todos os sRNAs em *tandem*, o uso das RiboJs será necessário, pois, garante que, ao serem transcritos na célula, os sRNAs serão desconectados do operon e, assim, possam atingir e se hibridizar com o *riboswitch* alvo. Este operon foi idealizado e está descrito na figura 37.

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.



Fonte: o autor.

Os oligos para síntese da sequência completa já foram sintetizados e o operon está sendo montado. Nosso grupo de pesquisa continua o desenvolvimento desse trabalho para montagem da linhagem industrial final que apresente como característica a produção elevada de purinas. Estas, mantidas dentro da célula, poderão ser desviadas para outras rotas metabólicas como a da produção da 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)90233-1 .
- HELMMLING, 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.; PEDROLI, 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.; PEDROLI, 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.

PEDROLI, 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.

PEDROLI, 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. Dereglulation 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.

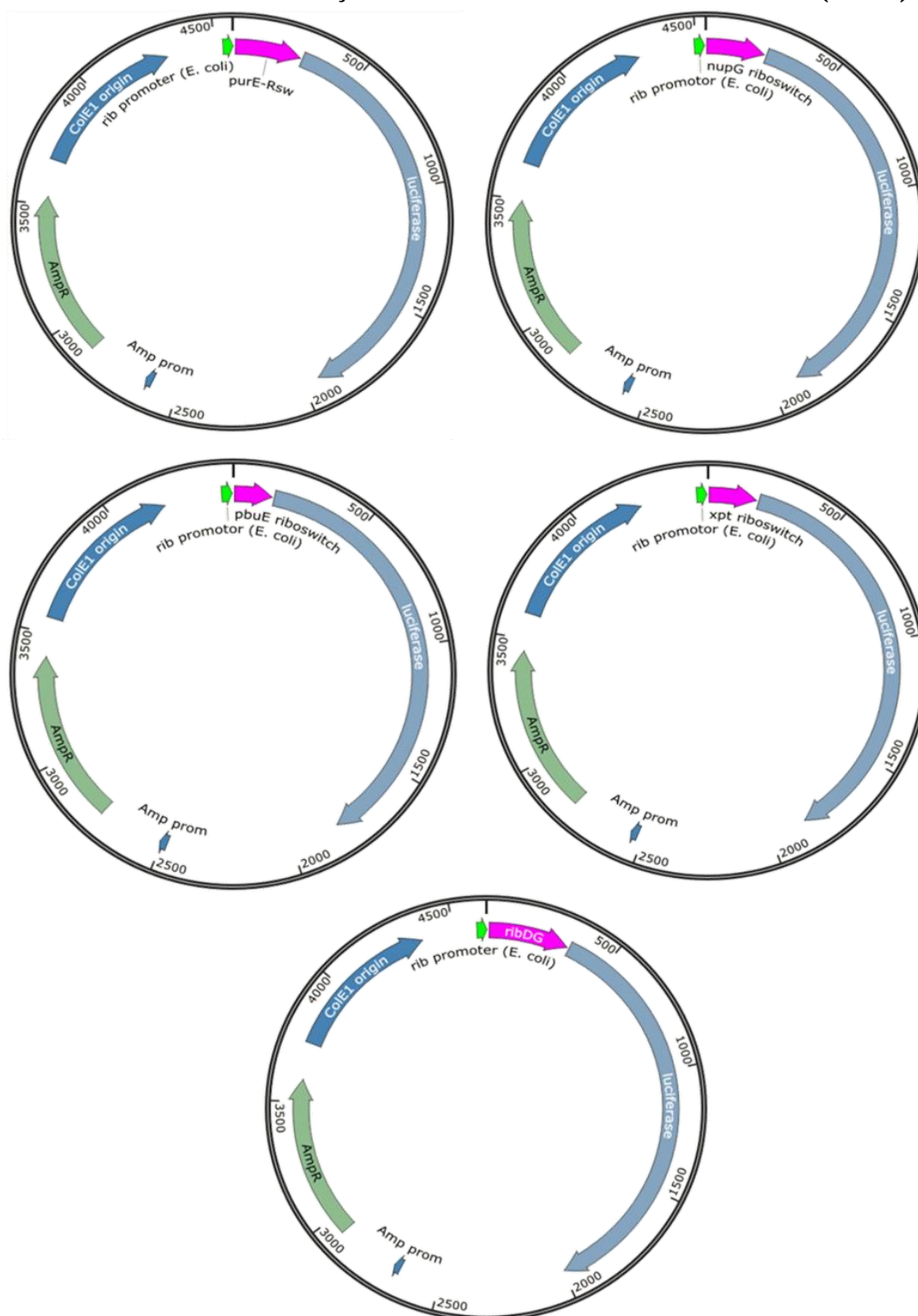
YANG, S.; WANG, Y.; WEI, C.; LIU, Q.; JIN, X.; DU, G.; CHEN, J.; KANG, Z. A new sRNA-mediated posttranscriptional regulation system for *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 2986-2995, 2018.

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.

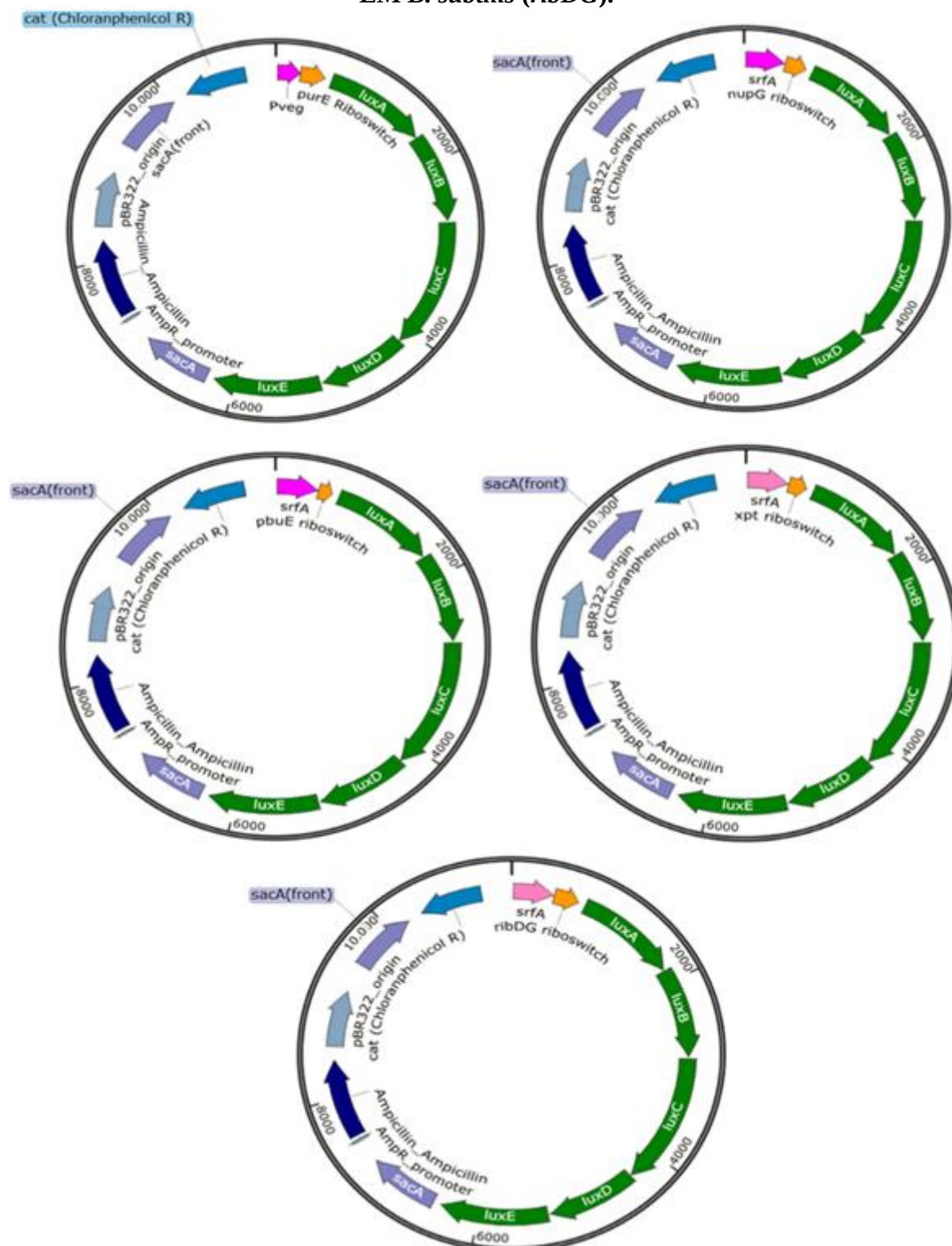
ZADEH, J. N.; STEENBERG, C. D.; BOIS, J. S.; WOLFE, B. R.; PIERCE, M. B.; KHAN, A. R.; DIRKS, R. M.; PIERCE, N. A. NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, p. 170-173, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A - MAPA DOS PLASMÍDEOS PARA CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DOS RIBOSWITCHES QUE REGULAM GENES E OPERONS DO METABOLISMO DE PURINA (*purE*, *nupG*, *pbuE* E *xpt*) E O RIBOSWITCH REGULADOR DO OPERON PARA PRODUÇÃO DA RIBOFLAVINA EM *B. subtilis* (*ribDG*).

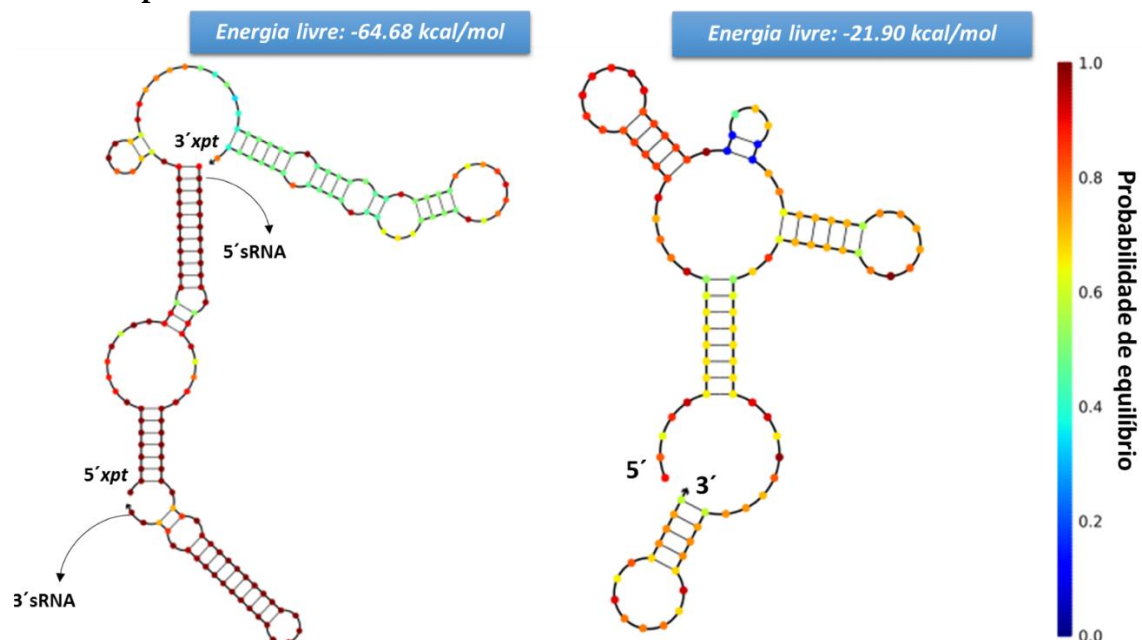


APÊNDICE B - MAPA DOS PLASMÍDEOS PARA INTEGRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DOS *RIBOSWITCHES* QUE REGULAM GENES E OPERONS DO METABOLISMO DE PURINA (*purE*, *nupG* *pbuE* E *xpt*) E O *RIBOSWITCH* REGULADOR DO OPERON PARA PRODUÇÃO DA RIBOFLAVINA EM *B. subtilis* (*ribDG*).

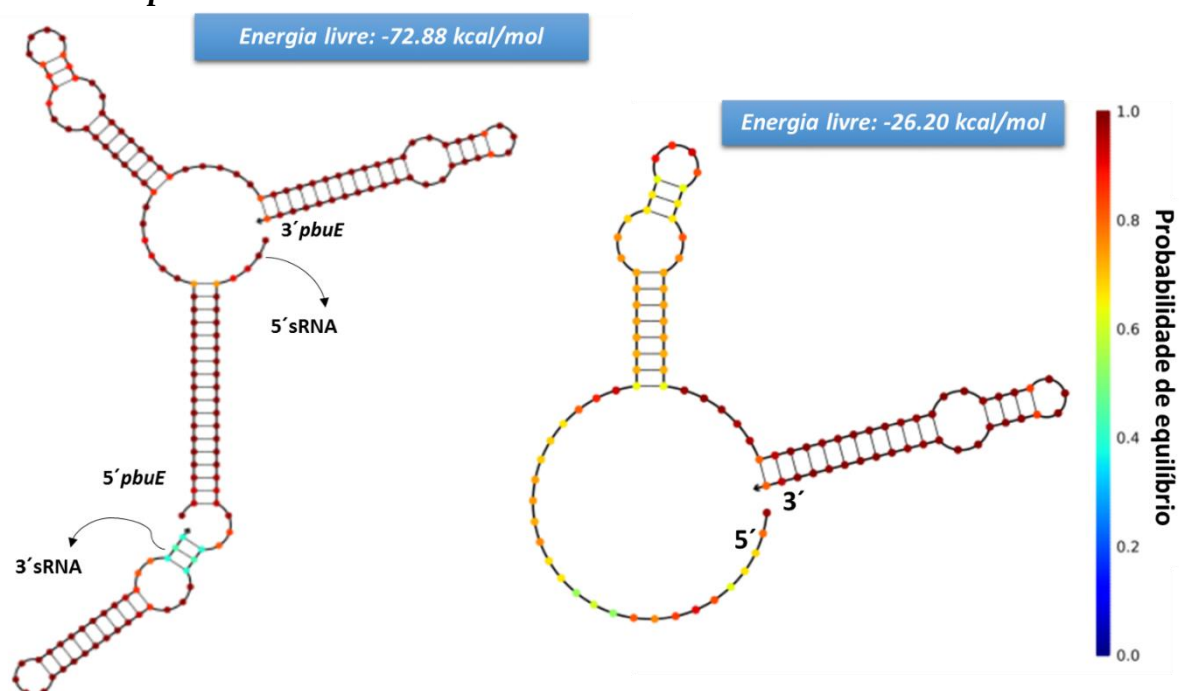


APÊNDICE C - ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS SIMULADAS NO SOFTWARE NUPACK DOS COMPLEXOS *RIBOSWITCHES*-sRNAs E DOS *RIBOSWITCHES* RELACIONADOS AO METABOLISMO DE PURINA EM *B. subtilis*.

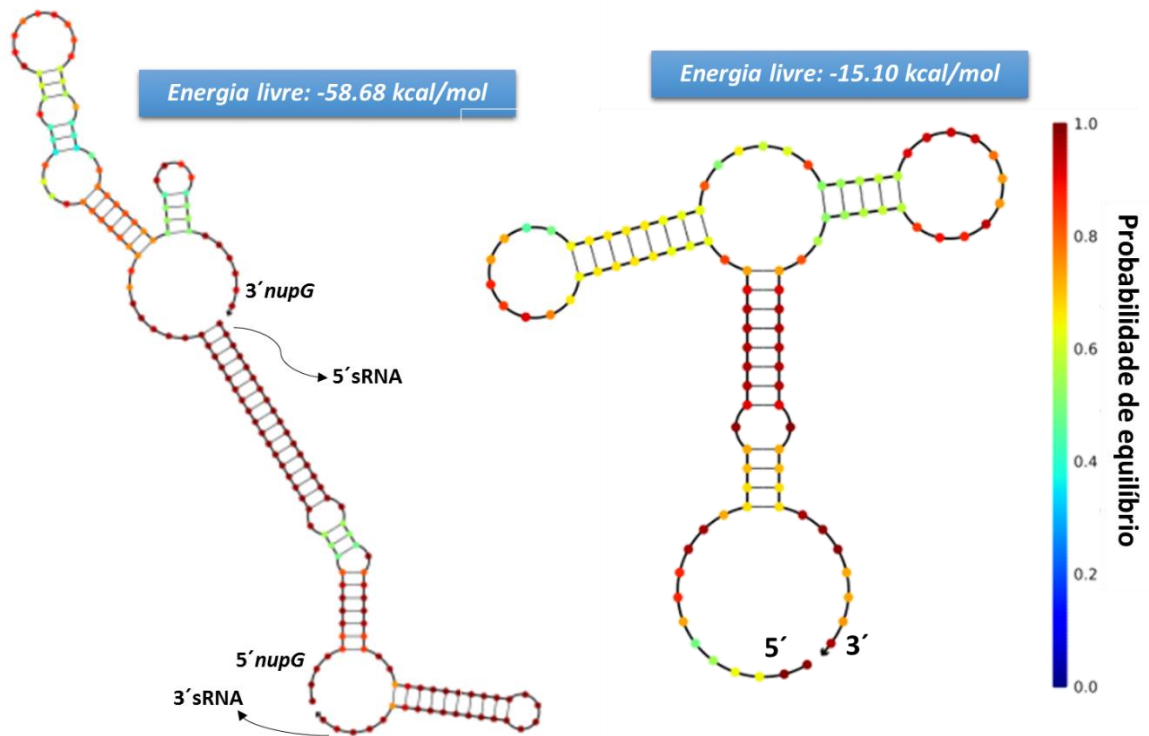
Riboswitch xpt



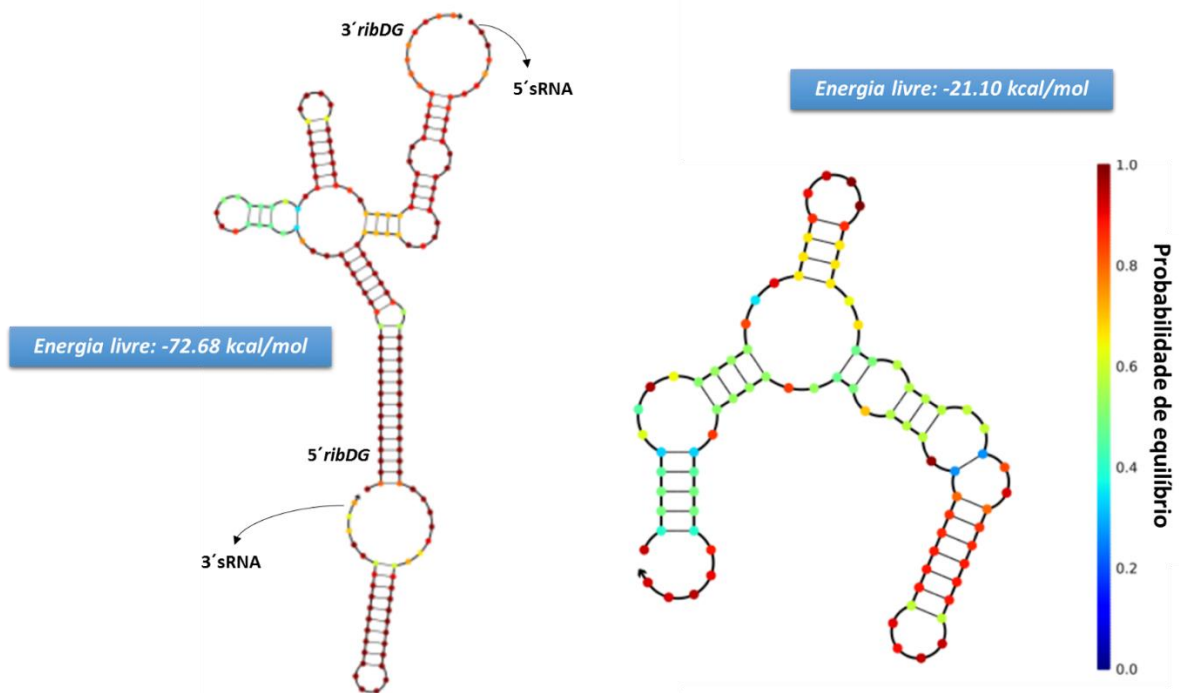
Riboswitch pbuE



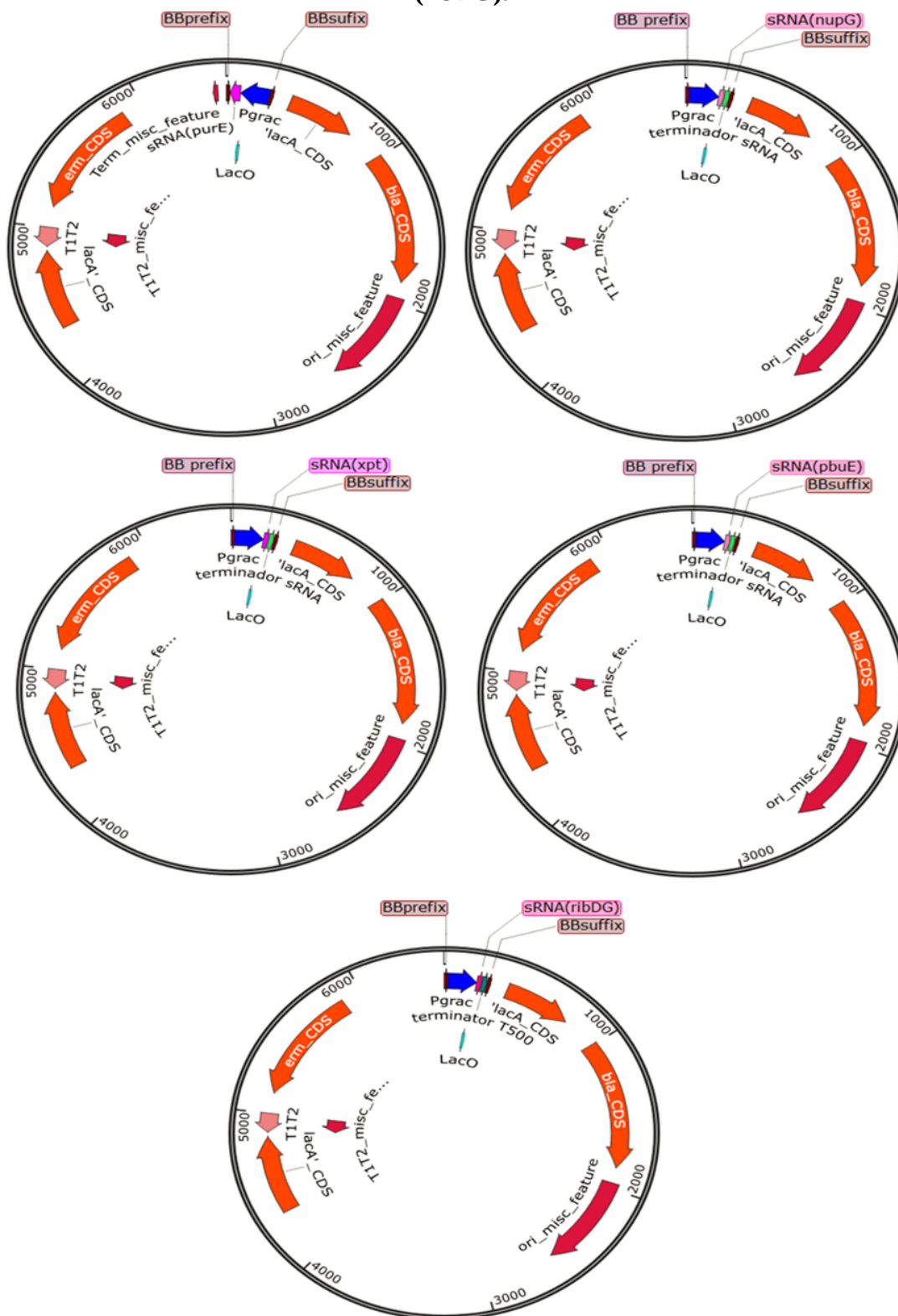
Riboswitch *nupG*



Riboswitch *ribDG*



APÊNDICE D - MAPA DOS PLASMÍDEOS PARA INTEGRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DOS PEQUENOS RNAs SINTÉTICOS QUE FORAM DESENHADOS PARA INTERFERIR NA REGULAÇÃO GÊNICA REALIZADA PELOS RIBOSWITCHES DE PURINA (*purE*, *nupG*, *pbuE* E *xpt*) E O RIBOSWITCH REGULADOR DO OPERON PARA PRODUÇÃO DA RIBOFLAVINA EM *B. subtilis* (*ribDG*).



CAPÍTULO II

Artigos publicados em periódicos

- PEDROLI, D. B.; RIBEIRO, N. V.; SQUIZATO, P. N.; JESUS, V. N.; COZETTO, D. A.; TUMA, R. B.; GRACINDO, A.; CESAR, M. B.; FREIRE, P. J. C.; COSTA, A. F. M.; **LINS, M. R. C. R.**; CORRÊA, G. G.; CERRI, M. O. Engineering Microbial Living Therapeutics: The Synthetic Biology Toolbox. **Trends in Biotechnology**, v. 37, p. 100-115, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.09.005;

Artigos em fase de preparação

- Caracterização *in vitro* e *in vivo* dos *riboswitches* de purinas;
- Reprogramação do metabolismo de purinas utilizando sRNAs sintéticos.